

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

**EFEITO DOS HERBICIDAS ATRAZINA, GLIFOSATO E QUINCLORAC
SOBRE A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA, A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E
A SOBREVIVÊNCIA DE GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**

Michele Flores Dornelles

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 3320-3500 - Fax: (051) 3339-1564

CEP 90619-900

Porto Alegre – RS - Brasil

2013

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

**EFEITO DOS HERBICIDAS ATRAZINA, GLIFOSATO E QUINCLORAC
SOBRE A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA, A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E
A SOBREVIVÊNCIA DE GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**

Michele Flores Dornelles

Orientador(a): Dra. Guendalina Turcato Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE - RS – BRASIL

2013

SUMÁRIO

Relação de Figuras	05
Artigo I	05
Artigo II.....	06
Artigo III.....	07
Relação de Tabelas	10
Artigo III.....	10
Agradecimentos	11
Resumo	13
Abstract	21
Apresentação	28
Introdução Geral	30

Corpo dos Artigos Científicos	37
Artigo I	38
Artigo II.....	71
Artigo III.....	98
Conclusões Gerais	131
Referências	133
Anexos	142
Anexo I - Certificado Revisão – Língua Inglesa.....	142
Anexo II - Normas de Publicação	144

RELAÇÃO DE FIGURAS

ARTIGO I: “Effect of the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)”

Figura 1: Gráficos A, B, C, D, E e F: Níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, e peroxidação lipídica nas brânquias de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.....67

Figura 2: Gráficos G, H, I, J, K e L: Níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, e peroxidação lipídica no fígado de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.....68

Figura 3: Gráficos M, N, O, P, Q e R: Níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, e peroxidação lipídica no músculo de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.....69

Figura 4: Gráficos S, T e U: Ganho de massa corporal durante o experimento comparando a massa corporal inicial e a massa final dos grupos, comprimento ao início

e ao final do experimento, e sobrevivência dos girinos de *Lithobates catesbeianus* até o final do experimento.....70

ARTIGO II: “Evaluation of metabolic parameters and lipid peroxidation in bullfrog tadpoles exposed to low concentrations of atrazine, glyphosate and quinclorac”

Figura 1: Graficos A, B, C, D, E e F: Níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, e peroxidação lipídica nas brânquias de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.....94

Figura 2: Graficos G, H, I, J, K e L: Níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, e peroxidação lipídica no fígado de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.....95

Figura 3: Graficos M, N, O, P, Q e R: Níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, e peroxidação lipídica no músculo de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.....96

Figura 4: Graficos S, T e U: Ganho de massa corporaç durante o experimento comparando a massa corporal inicial e a massa final dos grupos, comprimento ao início

e ao final do experimento, e sobrevivência dos girinos de *Lithobates catesbeianus* até o final do experimento.....97

ARTIGO III: “Implicações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a metamorfose e a sobrevivência em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae)”

Figura 1: Gráficos A, B, C e D: Média de massa corporal mensal e porcentagem de ganho com relação ao mês anterior (valor em cima da barra) para indivíduos em fase larval (fase G1) dos grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac até o início da metamorfose.....122

Figura 2: Gráficos E, F, G e H: Média mensal de comprimento total, comprimento da cabeça (C-CA) e comprimento rostro-caudal (C-R--C) para indivíduos em fase larval (fase G1) dos grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac até o início da metamorfose.....123

Figura 3: Gráficos I, J, K e L: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros posteriores para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac durante o experimento (fase G2).....124

Figura 4: Gráficos M, N, O e P: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros anteriores para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac durante o experimento (fase G3).....125

Figura 5: **Gráficos Q:** Média de massa corporal, e média de gordura abdominal nos indivíduos após o final do processo de metamorfose para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3); **Gráfico R e S:** Média do índice hepatossomático (IHS), e média do índice de gordura abdominal (IGA) para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3); **Gráfico T:** Média de comprimento total, média de comprimento dos membros posteriores, e média de comprimento dos membros anteriores (nos indivíduos após o final do processo de metamorfose para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3)).....126

Figura 6: **Gráfico U:** Coeficiente alométrico de crescimento dos membros dos indivíduos ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac; **Gráfico V:** Média de massa corporal dos indivíduos em fase larval ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G1); **Gráfico X:** Média de comprimento total, média de comprimento da cabeça (C-CA) e média do comprimento rostro-caudal (C-R-C) dos indivíduos em fase larval ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G1).....127

Figura 7: Comparação entre os fígados pós metamorfose entre um indivíduo controle um indivíduo exposto ao herbicida atrazina , um indivíduo exposto ao glifosato , e um indivíduo exposto ao quinclorac.....128

Figura 8: Anomalias visualizadas entre um indivíduo controle, um indivíduo exposto ao herbicida atrazina apresentando deformidade no corpo, um indivíduo exposto ao

glifosato apresentando deformidade na cauda e um indivíduo exposto ao quinclorac apresentando deformidade na cauda.....128

Figura 9: *Presença de fungos em indivíduos expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac e comparação com o indivíduo controle.....129*

Figura 10: *Presença de infecção bacteriana denominada de “Doença da Perna Vermelha” (Red Leg Disease) em indivíduos expostos aos herbicidas: 1) Indivíduo controle; 2) Indivíduo exposto ao herbicida atrazina; 3) Indivíduo exposto ao glifosato; 4) Indivíduo exposto ao quinclorac.....129*

RELAÇÃO DE TABELAS

ARTIGO III: “Implicações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a metamorfose e a sobrevivência em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae)”

Tabela 1: Número de indivíduos no início do experimento, número de indivíduos ao final do experimento, número de indivíduos que atingiram a metamorfose e número de girinos sem indícios de presença de membros ao final do tempo total do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac.....130

AGRADECIMENTOS



Agradeço imensamente a realização deste mestrado às pessoas que conseguiram entender minhas ausências e as noites em claro, buscando fazer melhor aquilo a que me propus. Obrigada pela compreensão aos homens da minha vida: meu filho Lucca, meu marido Mauricio, meu irmão Tiago e meu pai Mr. Pouls! Sem vocês eu nada seria...

Agradeço à Graça, minha madrinha por sempre me apoiar e me abraçar com seus grandes braços que acolhem o mundo e a meus primos Gabriel e Gérald, a minha mãe Lorena, e a Denise pela grande ajuda.

Agradeço à minha orientadora pelos conselhos, pela força e principalmente por abrir as portas do seu laboratório após tantas portas fechadas. Muito obrigada por acreditar e confiar!

Agradeço aos grandes professores que contribuíram para que esta caminhada pudesse chegar ao final, como os mestres Dr. Taran Grant, Dr. Néelson Ferreira Fontoura, Dr. Júlio César Bicca Marques, e o Dr. Carlos Graeff Teixeira.

Agradeço à Luana Oliveira dos Santos pela atenção durante estes dois anos.

Agradeço a atenção do Sr. Jorge e da Juliana do Ranário Ranasul pelo auxílio com a demanda de girinos durante estes dois anos.

Agradeço à Equipe do Laboratório de Fisiologia da Conservação, pelo grande apoio, carinho e amizade, obrigada André, Artur, Bruna, Betânia, Daiana, Fernando, Gian, Kaiane, Maiara, Patrícia, Priscila, Professor Dr. Héctor, Rodrigo, Sarah, Tanilene, e Vitória.

Agradeço aos grandes amigos que fiz nesta trajetória, obrigada Alejandro, Anamélia, Camila, Elisa, Gianfranco, José Ricardo, Maria Rita, Nancy, Renata, Thiago, Thais e Willians.

Agradeço aos meus amigos, todos os que torceram para que tudo desse certo, e que compreenderam minha ausência nestes últimos dois anos, obrigada Dai, Dani, Déia, Mary, Nessa e Sheila.

Muito obrigada a todos!!!



RESUMO

O Século XX é marcado por inúmeros avanços tecnológicos, fato este que permitiu com que setores como os relacionados à alimentação, saúde e agricultura rapidamente evoluíssem. Contudo, tais melhorias estão atreladas a utilização de compostos quimicamente sintetizados, expondo o homem e o meio ambiente a compostos nocivos, com propriedades muitas vezes desconhecidas (Oga, 2003).

Químicos agrícolas são comumente utilizados em plantações no mundo todo, com a finalidade de evitar danos às colheitas (Moreira *et al.*, 2002). Estas aplicações se justificam pelo fato de que uma porcentagem em torno de 10% das safras acaba sendo perdida em razão de pragas em geral, portanto, o uso de agroquímicos está atrelado não só a razões econômicas, mas também técnicas e sociais (Mídio e Martins, 1997).

De acordo com Larini (1999), e Poleza *et al.* (2008) o aumento no uso de agrotóxicos, e a aplicação excessiva destes, têm causado grandes impactos ao meio ambiente e danos à saúde humana, além de potencialmente afetar organismos aquáticos devido ao carreamento dos agroquímicos para áreas adjacentes as da lavoura.

Atualmente, os agrotóxicos são os contaminantes ambientais aquáticos mais graves oriundos de atividades antropogênicas. Este tipo de poluição, de difícil identificação e monitoramento, acaba ocasionando prejuízos ao homem e ao meio ambiente, devido às características destes compostos e sua persistência na biosfera, o que pode influenciar o fluxo de energia, a estrutura e a função das comunidades naturais, acarretando por sua vez, impactos em níveis moleculares e teciduais entre os indivíduos (Berti *et al.*, 2009; Bueno-Guimarães *et al.*, 2001).

Herbicidas dominam o mercado, estando entre os tipos de agrotóxicos mais utilizados e comercializados em todo o mundo (Stenersen, 2004). Tais compostos químicos são passíveis de ocasionar efeitos em organismos não alvos, sendo a presença inicial destes compostos verificada primeiramente através de alterações em níveis bioquímicos, antes de alterações morfológicas tornarem-se visíveis. A monitorização destas respostas bioquímicas pode fornecer os primeiros sinais de alerta antes de aspectos como morbidade e mortalidade se tornarem visíveis em uma população. Desta forma, os efeitos da poluição no metabolismo celular e seus constituintes, podem ser indicadores confiáveis na monitorização dos níveis de xenobióticos no ambiente (Roy e Hanninen, 1993).

Herbicidas contendo princípios ativos como: atrazina - uma triazina de primeira geração (Tomlin, 1994); glifosato - um aminoácido fosfonado (Midio e Martins, 1997), descrito como “seguro e ambientalmente benigno” pelos fabricantes, sem o potencial de causar efeitos adversos a anfíbios ou girinos (Lajmanovich, 2011); e quinclorac - um ácido quinolinocarboxílico (Tomlin, 1994), citado na bula do produto como “nocivo para organismos aquáticos, podendo provocar efeitos nefastos” são utilizados em larga escala em todo o mundo (Dörfler *et al.*, 1997; Howe *et al.*, 2004; Miron *et al.*, 2005), e podem afetar diretamente animais aquáticos, uma vez que a absorção destes químicos pode ocorrer através das brânquias ou da superfície corporal, refletindo em respostas fisiológicas por parte dos animais expostos (Miron *et al.*, 2005).

Anfíbios em fase larval são extremamente suscetíveis a estressores ambientais, como poluentes, e segundo Stebbins e Cohen (1995), com base em diferentes referências literárias sobre o efeito de compostos tóxicos em anfíbios, este grupo é particularmente sensível a modificações no ambiente, podendo ser considerados como

espécies indicadoras para estudos para verificação de efeitos sobre as modificações ambientais.

Tendo em vista a suscetibilidade de anfíbios em fase larval a estressores ambientais, como pesticidas, escolhemos como modelo para a realização do presente trabalho girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).

A rã touro, ou *Lithobates catesbeianus*, se caracteriza por ser uma espécie de ranídeo exótica no Brasil, originária da América do Norte e introduzida no país na década de 30. A história natural deste anuro é regulada por uma série de fatores bióticos e abióticos, os quais interferem diretamente em sua ecologia, como disponibilidade de recursos alimentares, índices de precipitação e temperatura (Cunha e Delariva, 2009).

De acordo com Allran e Karasov (2000), Blaustain e Wake (1995) e Ezemonye e Tongo (2009) o declínio no número de anfíbios em muitas partes do mundo pode estar ligado a fatores como mudanças climáticas, presença de radiação ultravioleta, ou doenças. Contudo, este declínio também está relacionado a influências antropogênicas como, destruição ou fragmentação dos habitats destes animais ou presença de contaminantes ambientais, como agrotóxicos e fertilizantes.

Sendo assim, objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito dos herbicidas glifosato, atrazina e quinclorac sobre a composição bioquímica nos níveis de glicogênio, lipídeos, triglicerídeos, colesterol, proteínas, níveis de peroxidação lipídica, sobrevivência, e sucesso no desenvolvimento de girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) expostos a diferentes concentrações dos herbicidas atrazina (Primóleo[®] - Syngenta 400g/L), glifosato (Roundup Original[®] Monsanto - 360g/L); e quinclorac (Facet[®] Basf - 500g/Kg), baseando-se em dados citados na literatura por

Lambropoulou *et al.* (2002), Marchezan *et al.* (2007) Paulino (2012), Silva (2003), e Silva *et al.* (2009), e descritos na legislação para tais concentrações.

Para a realização deste estudo foram adquiridos girinos vivos de um ranário comercial (Ranasul) localizado no município de Imbé, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os animais possuíam 4 meses de idade e ausência de membros. Os animais foram divididos em aquários contendo 12 litros de água, com aeração constante, temperatura da água em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6.2 ± 0.6 , e ciclo de 12 horas de claro/escuro. O período de aclimatação foi de 7 dias. No oitavo dia após o início do experimento os herbicidas foram introduzidos nos aquários. O período de exposição foi de 7 dias. Os experimentos foram realizados em duplicata (dois aquários para cada grupo), sendo os aquários subdivididos da seguinte forma:

Artigo I: n= 288 girinos, subdivididos em: grupos controle 7 e 14 dias; grupo atrazina: concentrações de 5, 10, e 20 $\mu\text{g/L}$; grupo glifosato: concentrações de 36, 72, e 144 $\mu\text{g/L}$; grupo quinclorac: concentrações de 0,05; 0,10, e 0,20 $\mu\text{g/L}$.

Artigo II: n= 76 girinos, subdivididos em: grupo controle; grupo atrazina: concentração de 2,5 $\mu\text{g/L}$; grupo glifosato concentração de 18 $\mu\text{g/L}$; grupo quinclorac: concentração de 0,025 $\mu\text{g/L}$.

Ao final do tempo de estudo de 14 dias, todos os animais foram eutanasiados pelo método crioanestésico. Foram removidas as brânquias esquerda e direita, fígado e músculo de cada indivíduo através de dissecação em uma placa de petri sobre gelo.

Os tecidos foram utilizados para a realização das análises bioquímicas dos níveis de glicogênio (extração pelo método de Van Handel (1965) e quantificado usando o Kit Comercial Glucose Oxidase - Labtest), proteínas totais (determinado pelo Método Colorimétrico do Biureto, quantificado pelo Kit Total Proteins - Labtest), lipídeos,

triglicerídeos e colesterol (extração pelo método clorofórmio: metanol (2:1) (Folch *et al.*, 1957), lipídios foram determinados pela reação específica sulfofosovanilina (Frings and Dunn, 1970), triglicerídeos determinados usando o Kit Comercial GPO-ANA (Bio-Diagnostic) através do método de lipoproteína lípase, e colesterol determinado pelo Kit Liquiforme (Labtest) usando o método enzimático-colorimétrico), e avaliação dos níveis de peroxidação (medido através da técnica de TBA-RS (substâncias reativas de TBA), que consiste no aquecimento da amostra na presença de ácido tiobarbitúrico, sob condições ácidas e mensuração da formação de um produto de cor - Bueges e Aust, 1978), para as diferentes concentrações dos pesticidas.

Todas as análises bioquímicas dos tecidos foram realizadas em quadruplicata pelo método espectrofotométrico.

A exposição à atrazina, glifosato e quinclorac, em concentrações encontradas no meio ambiente e/ou permitidas na água potável, induziu uma redução significativa nos níveis de glicogênio e lipídios totais nas brânquias, fígado e músculo. Os níveis de triglicerídeos nas brânquias aumentaram após a exposição ao glifosato e diminuíram após exposição à atrazina e quinclorac, mas no fígado e no músculo, seus níveis diminuíram após a exposição aos três herbicidas. A concentração de colesterol e de proteínas totais diminuiu somente no fígado e no músculo para todos os três herbicidas. Todos os tecidos expostos apresentaram aumento nos níveis de peroxidação lipídica após exposição a todos os herbicidas (**Artigo I**).

Girinos expostos a concentrações extremamente baixas destes herbicidas mostraram uma redução dos níveis de glicogênio e triglicerídeos em todos os tecidos, bem como um aumento na peroxidação lipídica, em comparação com animais controle. Os níveis de lipídios totais nas brânquias e músculo aumentaram em animais expostos à

atrazina, e nas brânquias de animais expostos ao glifosato, mas diminuíram nas brânquias, fígado e músculo após exposição quinclorac. Os níveis de colesterol aumentaram nas brânquias e fígado após exposição à atrazina e aumentaram nas brânquias e músculo após exposição ao glifosato, mas diminuíram no fígado após exposição ao quinclorac. Níveis de proteínas totais nas brânquias diminuíram após exposição a todos os herbicidas, aumentaram no músculo após exposição à atrazina e aumentaram no fígado e no músculo após exposição ao quinclorac (**Artigo II**).

Artigo III: n= 50 girinos, subdivididos em: grupo controle; grupo atrazina: concentração de 5,0 µg/L; grupo glifosato: concentração de 36 µg/L; grupo quinclorac: concentração de 0,05 µg/L.

Após sete dias de exposição aos herbicidas, os animais foram completamente removidos para aquários preenchidos somente com água desclorada, com as mesmas condições de temperatura, pH e fotoperíodo iniciais. Foram realizadas medições biométricas mensais, levando em consideração fatores como massa corporal, comprimento corporal total, tamanho dos membros, além do registro fotográfico do desenvolvimento dos animais e de possíveis anomalias corporais a fim de se avaliar a evolução da fase larval até o desenvolvimento completo da metamorfose. Após a finalização do processo de metamorfose os animais foram eutanasiados através do método crioanestésico com posterior transecção da medula espinal dos animais adultos. O fígado e a gordura abdominal foram removidos, fotografados e pesados para avaliação do índice hepatossomático ($IHS = \text{massa do fígado} / \text{massa corporal} \times 100$), e realização do índice de gordura abdominal ($IGA = \text{massa de gordura abdominal} / \text{massa corporal} \times 100$) de cada indivíduo que concluiu a metamorfose.

Indivíduos expostos aos herbicidas apresentaram aumento na massa corporal e no comprimento, desenvolveram membros e iniciaram o processo de metamorfose anteriormente ao grupo controle. A metamorfose foi concluída em 50%, 50%, 42% e 23% nos grupos controle, atrazina, glifosato, e quinclorac, respectivamente. Indivíduos expostos a atrazina apresentaram os menores índices de desenvolvimento ao final da metamorfose e o maior índice de gordura animal (IGA), sendo o índice hepatossomático (IHS) superior no grupo exposto ao quinclorac. Indivíduos expostos aos herbicidas apresentaram alterações no fígado, anomalias no corpo e na cauda, e desenvolvimento de infecções secundárias (**Artigo III**).

Verifica-se em girinos de *L. catesbeianus* que a exposição aos herbicidas testados neste estudo, induziu alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e nos níveis de peroxidação lipídica, os quais se mostraram aumentados. Estes resultados revelam uma ruptura da homeostase nos parâmetros metabólicos estudados nos girinos expostos, e conduz, possivelmente, a um aumento da demanda energética nesses animais, com a finalidade de reestabelecer o equilíbrio frente ao agente estressor. Também podemos supor com base em tais estudos, que a exposição aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac parece influenciar negativamente o padrão de desenvolvimento e a metamorfose em girinos de *L. catesbeianus*, diminuindo suas chances de sobrevivência. Nossos resultados sugerem que estas alterações e/ou modulações bioquímicas podem influenciar outros parâmetros biológicos, como o desenvolvimento e sucesso reprodutivo, ou até mesmo levar a um declínio na população de anfíbios expostos a esses herbicidas. No entanto, mais investigações são necessárias para determinar conclusivamente se estes resultados podem afetar, de forma significativa, o ciclo de vida desta, e de outras espécies de anfíbios.

Todos os protocolos de pesquisa utilizados neste trabalho foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande com número de registro CEUA 11/00250, conforme estabelecidos pela carta de aprovação 157/11- CEUA, Dezembro 2011.

ABSTRACT

The Twentieth Century is marked by numerous technological advances, a fact that allowed related sectors to food, health and agriculture have evolved rapidly. However, such improvements are linked to the use of compounds chemically synthesized by exposing humankind and the environment to harmful compounds, with components often unknown (Oga, 2003).

Agricultural chemicals are commonly used in plantations worldwide, in order to avoid crop damage (Moreira *et al.*, 2002). These applications are justified by the fact that a percentage around 10% of the crop is eventually lost because of pests in general, therefore, the use of agrochemicals is related not only for economic reasons, but also technical and social (Mídio and Martins, 1997).

According to Larini (1999) and Poleza *et al.* (2008) the increased use of pesticides and excessive application have been causing big impacts to the environment and human health, in addition to potentially affect aquatic organisms due to the agrochemical carriage into adjacent areas.

Currently, pesticides are the most serious aquatic environmental contaminants from anthropogenic activities. This type of pollution, of difficult identification and monitoring, has been causing damage to humans and the environment, due to the characteristics of its compounds and its persistence in the biosphere, which can influence the flow of energy, the structure and function of natural communities, resulting in turn, impacts at the molecular and tissue levels between individuals (Berti *et al.*, 2009; Guimarães-Bueno *et al.*, 2001).

Herbicides dominate the market, and they are among the types of pesticides the most used and marketed worldwide (Stenersen, 2004). Such chemicals may cause effects on non-target organisms and the initial presence of these compounds observed primarily through changes in biochemical levels before the morphological changes become visible. The monitoring of these biochemical responses can provide the earliest warning signs before aspects like morbidity and mortality become visible in a population. Thus, the effects of pollution on cellular metabolism and its constituents can be reliable indicators in monitoring levels of xenobiotics in the environment (Roy and Hanninen, 1993).

Herbicides containing active ingredients such as atrazine - a triazine first generation (Tomlin, 1994); glyphosate - an amino phosphonate (Midio and Martins, 1997), described as "safe and environmentally benign" by manufacturers, without the potential to cause adverse effects to the amphibians and tadpoles (Lajmanovich, 2011), and quinclorac - an acid quinoline (Tomlin, 1994), cited in product labeling as "harmful to aquatic organisms and may cause adverse effects" and it is used on a large scale worldwide (Dörfler et al. 1997; Howe et al. 2004; Miron *et al.*, 2005) and it may directly affect aquatic animals, since such chemical absorption may occur through the gills or body surface, reflecting on the physiological responses of the exposed animals (Miron et al., 2005).

Amphibians in larval stage are extremely susceptible to environmental stressors, such as pollutants, and according to Stebbins and Cohen (1995), based on different literary references on the effect of toxic compounds in amphibians, this group is particularly sensitive to changes in the environment and can be considered as indicator species for studies for effects on environmental changes.

In view of the susceptibility of larval amphibians to environmental stressors, such as pesticides, we have chosen as a model for the realization of this work tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), the bull frog, or *Lithobates catesbeianus*, is characterized as an exotic frog in Brazil, originally from North America and introduced in the country in the 30s. The natural history of this anuran is regulated by a number of biotic and abiotic factors, which directly interfere in their ecology, such as availability of food resources, temperature and precipitation indices (Cunha and Delariva, 2009).

According to Allran and Karasov (2000), Blaustain and Wake (1995) and Ezemonye and Tongo (2009) the decline in the number of amphibians in many parts of the world can be related to factors such as climate change, the presence of ultraviolet radiation, or diseases. However, this decline is also related to anthropogenic influences such as, destruction or fragmentation of habitats of these animals or the presence of environmental contaminants such as pesticides and fertilizers.

Thus, the aim of the present study was to verify the effect of the herbicides atrazine, glyphosate, and quinclorac on the biochemical composition in the levels of glycogen, lipids, triglycerides, cholesterol, protein, lipid peroxidation levels, survival, and success in developing of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) exposed to different concentrations of the herbicides atrazine (Primóleo[®] - Syngenta 400g/L), glyphosate (Roundup Original[®] Monsanto - 360g/L) and quinclorac (Facet[®] Basf - 500g/Kg), based on data reported in the literature by Lambropoulou et al. (2002), Marchezan *et al.* (2007) Pauline (2012), Silva (2003) and Silva *et al.* (2009), and described in the legislation for such concentrations.

For the purposes of this study, live tadpoles were acquired from a commercial frog farm (Ranasul) in the municipality of Imbé, state of Rio Grande do Sul, Brazil. All

animals were 4 months of age and absence of limbs. These animals were arranged in aquariums containing 12 L of water each, with constant aeration, a water temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6.2 ± 0.6 , and a 12-hour light/dark cycle. The acclimation period was 7 days. On the eighth day after the start of the experiment, the herbicides were added to the aquarium water. The exposure period was 7 days. The experiments was performed in duplicate (two aquariums for each group), with aquariums subdivided as follows:

Article I: n= 288 tadpoles, subdivided in: 7- and 14-day control groups; atrazine groups: concentrations of 5, 10, and 20 $\mu\text{g/L}$; glyphosate groups: concentrations of 36, 72, and 144 $\mu\text{g/L}$; quinclorac groups: concentrations of 0.05, 0.10, and 0.20 $\mu\text{g/L}$.

Article II: n= 76 tadpoles, subdivided in: control group; atrazine group: concentrations of 2.5 $\mu\text{g/L}$; glyphosate group: concentrations of 18 $\mu\text{g/L}$; quinclorac group: concentrations of 0.025 $\mu\text{g/L}$.

At the end of the 14-day study period, all animals were euthanized by the freezing method. Left and right gills, liver, and muscle were removed from each animal by dissection in a glass petri dish over ice. Tissue specimens were then used for biochemical analysis of the levels of glycogen (extracted by Van Handel's method (1965) and quantified using a commercial Glucose Oxidase Kit - Labtest), total protein (determined by the colorimetric biuret method, quantified by Kit Total Proteins - Labtest), lipids, triglycerides, and cholesterol (extracted by the chloroform: methanol method (2:1) (Folch *et al.*, 1957), lipids were determined through the specific sulfo-phospho-vanillin reaction (Frings and Dunn, 1970), triglycerides determined using the commercial Triglycerides GPO-ANA Kit (Bio-Diagnostic) through the lipoprotein lipase method, and cholesterol was determined with the Liquiform Kit (Labtest) using the enzymatic colorimetric method), and evaluation of lipid peroxidation levels

(measured through the TBA-RS (TBA-reactive substances) technique, which consists of heating the sample in the presence of thiobarbituric acid, under acidic conditions, and measuring the formation of a color product - Buege and Aust, 1978), for the different concentrations of pesticides.

All biochemical analyses of tissue specimens were performed, in quadruplicate, by spectrophotometric methods.

Atrazine, glyphosate, and quinclorac exposure, at concentrations found in the environment or allowed in drinking water, induced a significant decrease in levels of glycogen and total lipids in the gills, liver, and muscle. Triglycerides levels in the gills increased after exposure to glyphosate and decreased after exposure to atrazine and quinclorac, but in the liver and muscle, their levels decreased on exposure to all three herbicides. The concentration of cholesterol and total protein declined only in the liver and muscle for all three herbicides. All tissues exhibited increased lipid peroxidation after exposure to the herbicides (**Article I**).

Tadpoles exposed to extremely low concentrations of these herbicides, showed a reduction of glycogen and triglyceride levels in all tissues, as well as an increase in lipid peroxidation, as compared with control animals. Total lipid content in the gills and muscle increased in animals exposed to atrazine, as did lipid levels in the gills alone in animals exposed to glyphosate, but decreased in the gills, liver, and muscle after quinclorac exposure. Cholesterol levels increased in the gills and liver after atrazine exposure and increased in the gills and muscle after glyphosate exposure, but decreased in liver tissue after quinclorac exposure. Total protein levels in the gills decreased after exposure to all herbicides, increased in muscle after atrazine exposure, and increased in the liver and muscle after exposure to quinclorac (**Article II**).

Article III: n= 50 tadpoles, subdivided in: control group; atrazine group: concentrations of 5.0 µg/L; glyphosate group: concentrations of 36 µg/L; quinclorac group: concentrations of 0.05 µg/L.

After seven days of exposure to herbicides, the animals were completely removed for aquariums filled only with dechlorinate water, with the same initial conditions of temperature, pH and photoperiod. Biometric measurements were performed monthly, taking into account factors such as body mass, total body length, size of the members, in addition to the photographic record of the development of animals and possible body anomalies in order to evaluate the evolution of larval stage until the full development of metamorphosis. After the completion of the process of metamorphosis, the animals were euthanized by the freezing method with posterior spinal cord transection of the adult animals. The liver and abdominal fat were removed, photographed and weighed for evaluation of hepato somatic index (HIS= liver mass/ body weight x 100), and the abdominal fat index (AFI= abdominal fat mass/ body weight x 100) of each individual who has completed the metamorphosis.

Individuals exposed to herbicides showed an increase in body mass and length, developed members and initiated the process of metamorphosis previously to the control group. The metamorphosis was completed in 50%, 50%, 42% and 23% in the control groups, atrazine, glyphosate, and quinclorac respectively. Individuals exposed to atrazine showed the lowest development indices at the end of metamorphosis and the highest animal fat (AFI), being the hepato somatic index (IHS) higher in the group exposed to quinclorac. Individuals exposed to herbicides showed changes in the liver, abnormalities in the body and on the tail, and development of secondary infections (**Article III**).

It turns out in *L. catesbeianus* tadpoles that exposure to herbicides tested in this study induced significant changes in biochemical parameters and lipid peroxidation levels, which were increased. These results reveal a homeostasis break in the metabolic parameters studied in tadpoles exposed, and, possibly, to an increase in energy demand in these animals, in order to re-establish the balance due to the stressor agent. This imbalance may be related to increased energy expenditure in these animals in an attempt to maintain homeostasis when faced with an agrochemical stressor. We can also presume, based on such studies, that exposure to the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac appears to have a negative effect in the pattern of development and metamorphosis in tadpoles of *L. catesbeianus*, decreasing their chances of survival. Our findings suggest that these changes and/or biochemical modulations, can influence other biological parameters, such as development and reproductive success, or even lead to a decline in the population of amphibians exposed to these herbicides. However, further researches are required to determine conclusively if these results can affect, to a significant way, the life cycle of this, and the other amphibian species.

All research protocols used in this work were authorized by the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Animal Research Ethics Committee with registration number CEUA 11/00250, as set forth in approval letter number 157/11-CEUA, December 2011.

APRESENTAÇÃO

Na presente dissertação de mestrado optou-se por apresentar os resultados desenvolvidos em forma de artigos, sendo a subvisão em três artigos denominados: “Effect of the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)”, “Evaluation of metabolic parameters and lipid peroxidation in bullfrog tadpoles exposed to low concentrations of atrazine, glyphosate and quinclorac”, e “Implicações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a metamorfose e a sobrevivência em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae)”, os quais deverão ser encaminhados para uma possível publicação para as revistas *Biological Conservation*, *Aquatic Toxicology*, e *Revista Brasileira de Zoologia*, respectivamente.

Os temas de ambos os artigos envolvem a exposição aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac e as possíveis alterações sobre parâmetros bioquímicos, sobrevivência, e desenvolvimento de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a tais agroquímicos, portanto, o presente trabalho apresentará uma introdução geral comum para os três artigos.

Segue-se a introdução geral do trabalho a apresentação dos três artigos e as possíveis revistas para uma futura publicação.

No primeiro artigo são abordadas as possíveis alterações bioquímicas dos níveis de glicogênio, proteínas, triglicerídeos, colesterol, proteínas, lipídeos, níveis de peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *L. catesbeianus* expostos a três

diferentes concentrações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac encontradas em corpos d'água naturais.

O segundo artigo aborda também as possíveis alterações bioquímicas dos níveis de glicogênio, proteínas, triglicerídeos, colesterol, proteínas, lipídeos, níveis de peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *L. catesbeianus*, porém, expostos a concentrações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac abaixo das permitidas por lei e encontradas em corpos d'água naturais.

Já o terceiro artigo buscou avaliar as possíveis avaliações no desenvolvimento, na sobrevivência e no sucesso de metamorfose em girinos de *L. catesbeianus* expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac, experimento este com duração de nove meses, desde o período larval até o período pós metamorfose.

Devido ao fato de grande parte do presente trabalho ter sido redigida na língua inglesa, uma revisão apropriada foi realizada por um profissional devidamente qualificado, como atestado em anexo (Anexo I).

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de agroquímicos, habitualmente empregados em plantações a fim de evitar a disseminação de pragas ou danos às colheitas, encontra-se em vasta expansão no Brasil. Segundo Moreira *et al.* (2002), o país é responsável por cerca de 50% do consumo de defensivos agrícolas utilizados em toda a América Latina, ocupando o quarto lugar dentre os países consumidores de agrotóxicos.

Sendo que cerca de 9 a 10% das colheitas mundiais acabam sendo perdidas em razão de pragas em geral, como ervas daninhas, (aproximadamente 30.000 espécies existentes, as quais competem com as plantações, privando-as de umidade e nutrientes do solo, impedindo a incidência da luz solar e de seu crescimento), pode-se dizer que o aumento no uso de compostos herbicidas está diretamente ligado ao aumento na demanda de produção de alimentos por unidade de terra, a qual exige mudanças tecnológicas e práticas mais eficientes na produção agrícola (Midio e Martins, 1997).

Porém, alguns xenobióticos têm o potencial de causar danos em concentrações extremamente baixas no ambiente, sendo assim, o que é tradicionalmente considerado como uma baixa concentração de contaminante, não garante que os riscos biológicos não existam (Stebbins e Cohen, 1995).

Herbicidas empregados atualmente na agricultura apresentam um grande potencial de contaminação dos recursos hídricos em virtude de suas características como: alto potencial de deslocamento (lixiviação), persistência no solo, moderada solubilidade em água, adsorção moderada à matéria orgânica presente no solo, e

potencial de fixação aos solos e sedimentos, podendo alcançar lençóis freáticos (Moura *et al.*, 2008).

Dentre os químicos agrícolas utilizados no Brasil, podemos citar as triazinas (atrazina, cianazina, propazina, simazina, terbutilazina, trietazinas), os aminoácidos fosfonados (glifosatos), as benzenaminas (fenilaminas, fenilenodiaminas, dinitroanilinas, pedimetalina), os organofosforados (fenitrotion), e os fenilpirazóis (fipronil). Os efeitos agudos e crônicos destacados entre os seres humanos por exposição a tais produtos químicos englobam desde irritações dérmicas e mucosas até erupções cutâneas, danos hepáticos e renais, além de também apresentarem toxicidade a peixes e outros organismos aquáticos (Coutinho *et al.*, 2005).

Diversos poluentes químicos oriundos de efluentes industriais ou domésticos, de derrames acidentais, escoamento de pesticidas, ou através do manejo da agricultura, estão presentes no ambiente podendo representar um perigo em potencial à manutenção da homeostase em uma ampla variedade de ecossistemas. Embora ambientes aquáticos venham sendo contaminados por uma série de poluentes, poucos químicos possuem informações detalhadas e disponíveis a respeito de suas propriedades toxicológicas e possíveis efeitos adversos e riscos ao meio ambiente (Fentem e Balls, 1993).

Pesquisas com peixes jundiá expostos a herbicidas apresentaram como respostas fisiológicas desde elevações nas taxas de utilização de energia do metabolismo total em animais expostos a atrazina, até comprometimento nas taxas de crescimento e diminuição na alimentação em animais expostos ao quinclorac. Animais expostos a atrazina em laboratório também demonstraram distúrbios osmorregulatórios, redução na ingestão de alimentos, letargia e diminuição no tamanho (Miron, 2009); Animais intoxicados em laboratório com o glifosato, de acordo com Larini (1999), apresentaram

sintomas como estresse, aumento do ritmo respiratório, elevação da temperatura retal e hiperemia nos pulmões; Girinos de *Rana arenarum* expostos a diferentes concentrações do herbicida glifosato por 48h, apresentaram diminuição da atividade total da acetilcolinesterase (AChE), além de apresentar uma potencial indução de estresse oxidativo (Lajmanovich, 2011); Estudos realizados por Ezemonye e Tongo (2009) demonstraram que a atrazina pode acarretar desde efeitos fisiológicos e bioquímicos, até mortalidade em girinos expostos ao herbicida em concentrações mais elevadas; Hayes *et al.* (2002), sugerem que a atrazina é potencialmente um disruptor endócrino, capaz de inibir a testosterona e induzir a secreção de estrogênio. Os autores, ao examinar o efeito da atrazina no desenvolvimento sexual das rãs *Xenopus laevis*, obtiveram como resultado uma indução ao hermafroditismo, além de uma diminuição nos níveis de testosterona no plasma e uma desmasculinização em machos adultos; A exposição ao herbicida quinclorac acarretou alterações comportamentais em peixes (*Rhamdia quellen*) após exposição em concentrações próximas a CL⁵⁰, 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 (Cattaneo *et al.*, 2009); A administração de quinclorac na dieta de camundongos levou a uma redução no consumo de alimento, depressão no peso do fígado e alterações histopatológicas. Em ratos, um dos animais morreu, e além das alterações no fígado, os animais apresentaram atrofia tubular renal, atrofia testicular, depleção de linfócitos no baço e tumefação dos hepatócitos (Gajanayake, 2005); Outros resultados de estudos realizados com exposição de anfíbios à contaminantes agrícolas apresentaram alterações no desenvolvimento, no comportamento, deficiência imunológica e alterações das etapas de diferenciação sexual em animais expostos aos poluentes. Também houve uma

diminuição significativa no armazenamento de retinóides hepáticos e na concentração de ésteres de retinol. Tais desequilíbrios podem acarretar malformações, problemas de diferenciação celular e reprodução (Bridges e Semlitsch, 2000; Lefebvre, 2010).

Tendo em vista a periculosidade de agroquímicos comumente utilizados na agricultura mundial e a potencial contaminação de corpos d'água, e conseqüentemente dos organismos aquáticos expostos a tais estressores, o presente trabalho visou à exposição de girinos de *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (uma espécie exótica de fácil manipulação e adaptação às condições laboratoriais de acordo com Stebbins e Cohen (1995)), a três diferentes herbicidas amplamente utilizados nas lavouras agrícolas mundiais.

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, o estresse oxidativo, a sobrevivência, a duração, e o sucesso de metamorfose em girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802).

Um grande número de trabalhos científicos tem mostrado que pressões ambientais de origem antropogênica e não antropogênica vêm afetando negativamente as comunidades de anfíbios, dentre estas, destacam-se os químicos exógenos que chegam ao meio ambiente, sendo plenamente justificável o desenvolvimento do presente estudo. Na América latina declínios populacionais vêm sendo registrados desde a década de 80, sendo que mais de uma centena de espécies de anfíbios constam na lista de espécies ameaçadas reconhecidas pelo IBAMA. A poluição e principalmente a perda de habitat, são alguns dos fatores associados à diminuição do número de anfíbios por todo o planeta (Allran e Karasov, 2000; Blaustain e Wake, 1995; Both, 2009).

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

O fato da procriação, desova e fase inicial do ciclo de vida dos anfíbios ocorrer em ambiente aquático, torna estes animais passíveis de contaminação direta em decorrência do uso de pesticidas em plantações no entorno de seus habitats, acarretando consequências negativas para tais indivíduos. Marcantonio (2005) relaciona a poluição nos diferentes ambientes habitados por anfíbios com as alterações na densidade populacional destes animais, além da presença de mutações, más formações e até alterações do material genético.

Levando-se em consideração autores citados na literatura, a escolha das concentrações dos herbicidas utilizadas no presente trabalho se baseou nos seguintes trabalhos:

- **ATRAZINA**

Lambropoulou *et al.* (2002): Encontraram concentrações de atrazina entre 0,02 e 0,23 µg/L em amostras de seis estações no Rio Kalamas, localizado na Região de Epirus, ao noroeste da Grécia. Esta região se caracteriza por apresentar uma intensa atividade agrícola, englobando cultivos de milho, soja, vegetais, batatas, frutas cítricas e azeitonas; Paulino (2012): O autor cita que as concentrações de atrazina encontradas na natureza, não seguem um padrão, havendo desta forma bastante variação nas

concentrações encontradas. Para a análise subletal do herbicida atrazina em brânquias de *Prochilodus lineatus*, Paulino utilizou concentrações de 2,0; 10,0; e 25,0 µg/L. De acordo com o autor a contaminação dos corpos d'água por atrazina ocorre principalmente em áreas superficiais e lóaticas (rios e córregos), porém, em sistemas aquáticos lânticos como lagos e zonas úmidas estas concentrações podem ser até 10 vezes maior. Em águas adjacentes a campos tratados, pode-se encontrar entre as concentrações mais baixas de atrazina valores de 0,2 µg/L até 1.000 µg/L entre as concentrações mais altas, sendo valores em torno de 20 µg/L a média normal encontrada para o herbicida. De acordo com Coelho *et al.* (2001) o padrão de potabilidade no Brasil segundo a portaria N° 1469, de 29 de dezembro de 2000 estabelece como valor mínimo permitido para atrazina em corpos d'água de 2 µg/L, já na Europa, o limite permitido para a atrazina (e outros pesticidas) de acordo com a Drinking Water Directive (80/778/EEC,1989) e com a Water Quality-Regulations N° 1147, de 1989, do Reino Unido é de 0,1 µg/L, e para a USEPA (United States Environmental Protection Agency) o valor máximo de permitido da atrazina em corpos d'água é de 3 µg/L.

- **GLIFOSATO**

Silva (2003): Segundo o autor, no estado do Rio Grande do Sul, amostras de glifosato em um rio apresentaram concentrações de 20 a 30 µg/L do herbicida. O CONAMA (Brasil, 2005) através da resolução N° 357/2005 estabelece como valor máximo permitido para as águas classe II a concentração de glifosato de 0,065 mg/L, já a Portaria Brasileira N° 518/2004 (Brasil, 2004), estabelece uma concentração máxima de glifosato de 0,5 mg/L para padrão de potabilidade da água para consumo humano.

- **QUINCLORAC**

- Marchesan *et al.* (2007): Os pesquisadores relataram indícios do herbicida quinclorac em estudos de monitoramentos de rios no estado do Rio Grande do Sul/ Brasil, próximos a plantações de arroz. Os pesquisadores encontraram entre o ano de 2000/01 uma concentração mínima do herbicida no rio Vacacaí Mírim de 0,48 µg/L e máxima de 6,60 µg/L, sendo a concentração média de 1,57 µg/L, e entre os anos de 2001/02 no mesmo rio, uma concentração mínima de quinclorac de 1,87 µg/L e máxima de 3,81 µg/L, sendo a concentração média de 2,79 µg/L; Silva *et al.* (2009): Visando monitorar a ocorrência do quinclorac em águas superficiais de 7 regiões do sul do Brasil associadas ao cultivo de arroz irrigado entres os anos de 2007/2008 (6 no estado do Rio grande do Sul, e 1 em Santa Catarina), os autores encontraram nestes corpos d'água concentrações médias do herbicida de 0,077; 0,080; 0,100 e 0,110 µg/L; De acordo com Marchesan *et al.* (2007) as diretrizes para qualidade da água no Brasil, não incluem as concentrações máximas permitidas para o uso de quinclorac na agricultura (CONAMA, 1986; Rio Grande do Sul, 1989), tais limites para este herbicida, também não são estabelecidas pela legislação USEPA (USEPA, 2002) ou pela legislação Canadense (CCME, 2002).

CORPO DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO

I

*“Effect of the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)”*

**Effect of the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac
on biochemical parameters, lipid peroxidation, and survival
in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**

Dornelles, M.F.¹, Oliveira G.T.¹

¹ *Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação*

Correspondence to:

Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Faculdade de Biociências

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Laboratório de Fisiologia da Conservação

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250

CP. 1429

Porto Alegre, RS 90619-900

Brazil

Phone: 55-51-33203545 (ext. 8324)

Fax 55-51-3320-3612

E-mail: guendato@pucrs.br

Abstract

Increased use of pesticides worldwide has led to damage not only to natural ecosystems, but also to non-target species. This study assesses the effects of different concentrations of the herbicides atrazine, glyphosate, and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (bullfrog). 288 tadpoles were acquired from a frog farm in the south of Brazil. All animals were kept in aquariums under controlled laboratory conditions for 7 days, and exposed to commercial formulations of atrazine (5, 10, and 20 µg/L), glyphosate (36, 72, and 144 µg/L), and quinclorac (0.05, 0.10, and 0.20 µg/L) for 7 days thereafter. The concentrations used in this study are similar to the levels of these herbicides found in natural water bodies. After exposure, the gills, liver, and muscle of each animal were removed for quantitation of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation. Atrazine, glyphosate, and quinclorac exposure induced a significant decrease in levels of glycogen and total lipids in the gills, liver, and muscle. Triglycerides levels in the gills increased after exposure to glyphosate and decreased after exposure to atrazine and quinclorac, but in the liver and muscle, their levels decreased on exposure to all herbicides. Cholesterol and total protein levels declined only in the liver and muscle for all three herbicides. All tissues exhibited increased lipid peroxidation after exposure to all herbicides. In conclusion, exposure to the herbicides tested in this study induced significant changes in biochemical parameters and increased lipid peroxidation levels in tadpoles of *L. catesbeianus*.

Key Words: Bullfrog, Metabolic alterations, Lipid peroxidation, Agrochemicals

Introduction

New technologies and the growth of the world population have led to an expansion of global agribusiness. Around the world, 1.817 billion tons of grain are produced annually (IGC, 2012), leading to the consumption of an average 2.5 million tons of pesticides (Spadotto *et al.*, 2010).

This use of agrochemicals has been increasing gradually over recent decades. In the last ten years alone, worldwide use of agrochemicals rose 93% (Carneiro *et al.*, 2012), with no attendant increase in arable land—i.e. a greater amount of agricultural chemicals have been applied to the same planting area (Spadotto, 2006).

It is widely known that the use of pesticides is related to economic, technical and social factors (Midio and Martins, 1997), but their indiscriminate use has caused severe changes in the balance of ecosystems, such changes have influenced the flow of energy and the structure and function of natural communities, modifying the physical and biotic balance of these environments and causing impacts in exposed individuals at the tissue and molecular levels (Berti *et al.*, 2009, Poleza *et al.*, 2008). According to Blaustein and Johnson (2003), the abusive use of agrochemicals is one of the factors that have contributed to the degradation of habitats and the decline of biodiversity in aquatic environments, mainly due to the high potential for leaching, persistence and adsorption to organic matter present in the soil, as well as to the water solubility of these chemicals (Moura *et al.*, 2008).

Atrazine, glyphosate, and quinclorac are currently the most widely used herbicides worldwide (Dörfler *et al.*, 1997, Howe *et al.*, 2004, Galon *et al.*, 2009). The mode of action of these agricultural chemicals can include inhibition of photosynthesis

or other enzyme-mediated processes, such as inhibition of essential amino acid synthesis and growth inhibition (Oliveira Jr., 2001, Relyea, 2005, Tomlin, 1994).

Although herbicides target plant species, there is evidence that these agricultural chemicals are also linked to changes in amphibian communities. Exposure of these animals to herbicides can induce direct effects, such as mortality, and indirect effects, such as changes in biochemical and physiological parameters (Ezemonye and Tongo, 2009).

Excessive use of herbicides is one of the factors described by Blaustein and Johnson (2003) as responsible for directly affecting the development, reproduction, and survival of amphibian populations around the world.

Within this context, the present work aims to evaluate the effects of commercial formulations of the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation levels, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) exposed at concentrations cited in the literature as commonly found in natural water bodies (Lambropoulou *et al.*, 2002; Marchezan *et al.*, 2007; Paulino, 2012; Silva, 2003; Silva *et al.*, 2009).

Material and Methods

For the purposes of this study, 288 live tadpoles were acquired from a commercial frog farm (Ranasul) in the municipality of Imbé, state of Rio Grande do Sul, Brazil. All tadpoles were 4 months of age and the choice of individuals prioritized similar size, as recommended by Landis and Yu (2004), as well as absence of limbs. The animals were transported in air-filled plastic bags to the Conservation Physiology Laboratory at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), where

they were measured, weighed, and photographed individually. The animals were randomly divided into a control group (n=24), euthanized by the freezing method on arrival at the laboratory for verification of initial conditions, and an intervention group consisting of the remaining animals. These animals were arranged in twenty-two aquariums containing 12 L of water each (n=12), with constant aeration, a water temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6.2 ± 0.3 , and a 12-hour light/dark cycle.

The tadpoles were fed (5% of their biomass) once daily with the same fish feed used in the commercial frog farm, thus minimizing any effect of food stress. The acclimation period was 7 days. On the eighth day after the start of the experiment, the herbicides were added to the aquarium water. The introduction of liquid formulation herbicides (atrazine and glyphosate), and the herbicide formulation of powder (quinclorac), were performed through the dissolution of agrochemical in distilled water and added only once to the water of aquariums, in concentration to be used. The exposure period was 7 days.

The experiment was performed in duplicate (two aquariums for each group), with aquariums subdivided as follows: 7- and 14-day control groups; atrazine groups: concentrations of 5, 10, and 20 $\mu\text{g/L}$; glyphosate groups: concentrations of 36, 72, and 144 $\mu\text{g/L}$; quinclorac groups: concentrations of 0.05, 0.10, and 0.20 $\mu\text{g/L}$. In these experiments, we used commercial formulations of atrazine (Primóleo®, 400 g/L, Syngenta), glyphosate (Roundup Original®, 306 g/L, Monsanto), and quinclorac (Facet®, 500 g/Kg, Basf).

The chosen concentrations were based on mean values found in natural bodies of water, as cited by Lambropoulou *et al.* (2002), Marchezan *et al.* (2007) Paulino (2012), Silva (2003), and Silva *et al.* (2009). At the end of the 14-day study period, all animals were euthanized by the freezing method. The following structures were

removed from each animal by dissection in a glass petri dish over ice: left and right gills, liver, and muscle. Tissue specimens were then used for biochemical analysis of the levels of glycogen, total protein, lipids, cholesterol, and triglycerides and evaluation of lipid peroxidation levels for the different concentrations of pesticides.

All research protocols used in this work were authorized by the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Animal Research Ethics Committee with registration number CEUA 11/00250, as set forth in approval letter number 157/11-CEUA, December 2011.

Biochemical Analysis

All experimental determinations in tissue specimens were made by spectrophotometric methods, in quadruplicate, and all results expressed as mg/g of tissue.

Glycogen: Extracted by Van Handel's method (1965) and quantified as glucose after acid hydrolysis (HCl) and neutralization (Na₂CO₃) using a commercial Glucose Oxidase Kit (Labtest).

Total Proteins: The total protein concentration was determined by the colorimetric biuret method. The intensity of the color formed is proportional to the total protein concentration in the sample. Again, a commercial kit was used (Total Proteins Kit, Labtest).

Lipids, Triglycerides and Cholesterol: Extracted by the chloroform:methanol method (2:1) (Folch *et al.*, 1957). Lipids were determined through the specific sulfo-phospho-vanillin reaction (Frings and Dunn, 1970). Triglycerides were determined using the commercial Triglycerides GPO-ANA Kit (Bio-Diagnostic) through the lipoprotein lipase method, where triglycerides are hydrolyzed, resulting in the release of glycerol, which is then converted, oxidized and catalyzed by glycerophosphate. The reaction produces a violet color, where the intensity is proportional to the concentration of triglycerides in the sample. Cholesterol was determined with the Liquiform Kit (Labtest) using the enzymatic colorimetric method for the determination of total cholesterol in the sample, with ready-for-use liquid reagent.

Measurement of Lipid Peroxidation

Measurement of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)

Lipid peroxidation activity was measured through the TBA-RS (TBA-reactive substances) technique, which consists of heating the sample in the presence of thiobarbituric acid, under acidic conditions, and measuring the formation of a color product (Buege and Aust, 1978). Method: 150 μ l of 10% trichloroacetic acid (TCA), 50 μ l of homogenized tissue, 100 μ l of 0.67% thiobarbituric acid (TBA), and 50 μ l of distilled water are added to a test tube (total volume: 350 μ l). The tube is shaken, incubated at 100°C for 15 minutes, and cooled for 10 minutes. Then, 300 μ l of n-butyl alcohol is added to the sample for extraction of the colored product from aqueous solution. Tubes are shaken for 45 seconds and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm.

The supernatant is added to the spectrophotometer cuvette and read at 535nm. The concentration is expressed in nmol/mg of protein.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test for normality, Levene's test for homogeneity, and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni correction were used for comparison between the different experimental groups. The significance level was set at 5%. Statistical analyses were performed in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (Zar, 1996).

Results

Gills

Glycogen: All herbicides, at different concentrations, were associated with significant depletion in levels of glycogen in the gills. Animals exposed to atrazine (\bar{x} all concentrations= 28 mg glycogen/g wet weight), glyphosate (\bar{x} all concentrations= 27 mg glycogen/g wet weight), and quinclorac (\bar{x} all concentrations= 24 mg glycogen/g wet weight) showed a decrease of 97% to 98% as compared with the 7-day control group (\bar{x} = 1.513 mg glycogen/g wet weight) and the 14-day control group (\bar{x} = 998 mg glycogen/g wet weight). The 14-day control group also exhibited a decrease of approximately 34% in gill glycogen levels in relation to the 7-day control group (Figure 1A).

Total Lipids: Total lipid levels were decreased after exposure to all concentrations of atrazine (\bar{x} all concentrations= 0.133 mg total lipids/g wet weight). The reduction was 44% in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.239 mg total lipids/g wet weight) and 36% in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 0.209 mg total lipids/g wet weight). Only the highest concentration of glyphosate (\bar{x} = 0.187 mg total lipids/g wet weight) was associated with a decrease in lipid levels, a 22% and 10% reduction in relation to the 7-day and 14-day control groups respectively. Quinclorac (\bar{x} all concentrations= 0.164 mg total lipids/g wet weight) was associated with a 31% decrease in lipid levels in gill tissue, at all concentrations of the herbicide, in relation to the 7-day control group. Only the highest concentration (\bar{x} = 0.132 mg total lipids/g wet weight) was associated with a decrease (of 37%) in lipid levels as compared with the 14-day control group. A 12% reduction was observed between the 7-day and 14-day control groups (Figure 1B).

Triglycerides: Only the lowest concentrations of atrazine (\bar{x} all concentrations = 0.083 mg triglycerides/g wet weight) were associated with a decline in triglyceride levels. When compared to the 7-day control group (\bar{x} = 0.113 mg triglycerides/g wet weight), this was a 26% reduction, and 34% in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 0.125 mg triglycerides/g wet weight). Glyphosate (\bar{x} all concentrations= 0.162 mg triglycerides/g wet weight) was associated with a 43% increase in triglyceride levels in the gills for the lowest concentrations of the herbicide as compared with the 7-day control group, and a 30% increase in relation to the 14-day control group. Quinclorac (\bar{x} = 0.090 mg triglycerides/g wet weight) produced a 28% decrease in triglyceride levels, but only at the highest concentration of herbicide and when compared with the

14-day control group. There was no significant difference between the control groups (Figure 1C).

Cholesterol: There was no significant change in cholesterol levels in the gills of animals exposed to atrazine (\bar{x} all concentrations= 0.088 mg cholesterol/g wet weight), glyphosate (\bar{x} all concentrations= 0.147 mg cholesterol/g wet weight), or quinclorac (\bar{x} all concentrations= 0.053 mg cholesterol/g wet weight) in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.217 mg cholesterol/g wet weight) or the 14-day control group (\bar{x} = 0.221 mg cholesterol/g wet weight) (Figure 1D).

Total Proteins: There was no significant change in total protein levels in the gills of animals exposed to atrazine (\bar{x} all concentrations= 0.156 mg protein/g wet weight), glyphosate (\bar{x} all concentrations= 0.075 mg protein/g wet weight), or quinclorac (\bar{x} all concentrations= 0.068 mg protein/g wet weight) in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.278 mg protein/g wet weight) or the 14-day control group (\bar{x} = 0.281 mg protein/g wet weight) (Figure 1E).

Lipid Peroxidation: Exposure to atrazine led to an average increase of 183% in lipid peroxidation levels (\bar{x} all concentrations= 51 nmol TBARS/mg protein) as compared with the 7-day control group (\bar{x} = 18 nmol TBARS/mg protein) and a 219% increase in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 16 nmol TBARS/mg protein). In the glyphosate group, lipid peroxidation (\bar{x} all concentrations= 120 nmol TBARS/ mg protein) was 567% higher in relation to the 7-day control group and 650% higher in relation to the 14-day control group. The quinclorac group (\bar{x} all concentrations= 190 nmol TBARS/mg protein) appeared to be most impaired in terms of increased lipid

peroxidation: levels were 955% higher in relation to the 7-day control group, and 1,087% higher as compared with the 14-day control group. There was no significant difference in lipid peroxidation levels between the two control groups (Figure 1F).

Liver

Glycogen: As in the gills, exposure to all herbicides at all concentrations was associated with a decrease in glycogen levels in the liver. With atrazine (\bar{x} all concentrations= 113 mg glycogen/g wet weight), this was a 95% reduction as compared with the 7-day control group (\bar{x} = 2.145 mg glycogen/g wet weight) and a 91% reduction in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 1.250 mg glycogen/g wet weight). Glyphosate (\bar{x} all concentrations= 96 mg glycogen/g wet weight) was associated with a 96% decrease in relation to the 7-day control group, and a 92% reduction in relation to the 14-day control group. Quinclorac (\bar{x} all concentrations= 56 mg glycogen/g wet weight) was associated with the most marked decline in glycogen levels: a 97% reduction in relation to the 7-day control group and a 95% reduction as compared with the 14-day control group. Furthermore, there was a 41% reduction in glycogen levels in the 14-day control group in relation to the 7-day control group (Figure 2G).

Total Lipids: Atrazine (\bar{x} all concentrations= 0.218 mg total lipids/g wet weight) produced an 89% reduction in total lipids in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 1.930 mg total lipids/g wet weight) and a 91% reduction in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 2.387 mg total lipids/g wet weight). Glyphosate (\bar{x} all concentrations= 0.260 mg total lipids/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} all concentrations= 0.271 mg total lipids/g wet weight) induced an 86% reduction in relation to the 7-day control group. Glyphosate exposure induced an 89% decrease, and quinclorac exposure, and 87%

decrease in total lipid levels in liver as compared with levels found in the 14-day control group. There was no significant difference between the 7-day and 14-day control groups (Figure 2H).

Triglycerides: All concentrations of atrazine (\bar{x} all concentrations = 0.035 mg triglycerides/g wet weight) and glyphosate (\bar{x} all concentrations = 0.034 mg triglycerides/g wet weight) were associated with a 92% decline in liver triglyceride levels in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.417 mg triglycerides/g wet weight) and a 94% decline in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 0.618 mg triglycerides/g wet weight). Quinclorac (\bar{x} = 0.029 mg triglycerides/g wet weight) was associated with a 93% reduction when compared to the 7-day control group, and a 95% reduction in relation to the 14-day control group. There were no significant differences between the control groups (Figure 2I).

Cholesterol: Unlike in the gills, cholesterol levels in the liver declined after exposure to herbicides. Atrazine (\bar{x} all concentrations = 0.083 mg cholesterol/g wet weight) produced an 81% reduction in liver cholesterol levels as compared with levels found in the 7-day control group (\bar{x} = 0.433 mg cholesterol/g wet weight) and an 88% reduction as compared with levels found in the 14-day control group (\bar{x} = 0.676 mg cholesterol/g wet weight). Glyphosate (\bar{x} all concentrations = 0.108 mg cholesterol/g wet weight) produced 75% and 84% reductions in relation to the 7-day and 14-day control groups respectively. Exposure to quinclorac (\bar{x} all concentrations = 0.098 mg cholesterol/g wet weight) led to a 77% decrease in liver cholesterol levels in relation to the 7-day control group, and an 85% reduction in relation to the 14-day control group. There was no significant difference between the control groups (Figure 2J).

Total Proteins: Again, unlike in the gills, total protein levels in the liver decreased in response to herbicides exposure. Atrazine exposure (\bar{x} all concentrations= 0.128 mg protein/g wet weight) produced a reduction of 59% and 52% in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.313 mg protein/g wet weight) and the 14-day control group (\bar{x} = 0.269 mg protein/g wet weight) respectively. In the glyphosate group (\bar{x} all concentrations= 0.104 mg protein/g wet weight), the decrease was 67% in relation to 7-day controls, and 61% in relation to 14-day controls. In the quinclorac group (\bar{x} all concentrations= 0.077 mg protein/g wet weight), the reduction was 75% in relation to the 7-day control group and 71% in relation to the 14-day control group. There was no significant difference in protein levels between the control groups (Figure 2K).

Lipid Peroxidation: In liver tissue, lipid peroxidation increased after exposure to herbicides. In atrazine-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 88 nmol TBARS/ mg protein), levels showed an average increase of 418% in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 17 nmol TBARS/ mg protein) and 487% in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 15 nmol TBARS/ mg protein). In glyphosate-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 114 nmol TBARS/ mg protein), levels increased 571% in relation to the 7-day control group and 660% in relation to the 14-day control group. In the quinclorac group (\bar{x} all concentrations= 248 nmol TBARS/ mg protein), levels increased 1,359% as compared with the 7-day control group and 1,553% in relation to the 14-day control group. The highest concentration of quinclorac was associated with the highest increase in lipid peroxidation levels. There was no significant difference between the control groups (Figure 2L).

Muscle

Glycogen: All herbicides were associated with significant glycogen depletion in the muscle of exposed animals. In the atrazine group (\bar{x} all concentrations= 10 mg glycogen/g wet weight), muscle glycogen levels showed a 97% reduction in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 347 mg glycogen/g wet weight) and a 96% reduction in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 271 mg glycogen/g wet weight). In glyphosate-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 15 mg glycogen/g wet weight), the reduction was 96% in relation to the 7-day control group and 94% in relation to the 14-day control group, and in quinclorac-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 08 mg glycogen/g wet weight), there were 98% and 97% reductions in relation to the 7-day and 14-day control groups respectively. The 14-day control group also showed a 22% reduction in glycogen levels in relation to the 7-day control group (Figure 3M).

Total Lipids: Atrazine-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 0.052 mg total lipids/g wet weight) exhibited an 87% decrease in total lipid levels in relation to those in the 7-day control group (\bar{x} = 0.387 mg total lipids/ g wet weight) and an 83% decrease in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 0.310 mg total lipids/g wet weight). Glyphosate (\bar{x} all concentrations= 0.075 mg total lipids/g wet weight) was associated with 81% and 76% reductions in relation to the 7-day and 14-day control groups respectively. In quinclorac-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 0.062 mg total lipids/g wet weight), there was an 84% reduction in relation to the 7-day control group and an 80% reduction in relation to the 14-day control group. Furthermore, the 14-day control group showed a 20% decrease in total lipid levels in relation to the 7-day control group (Figure 3N).

Triglycerides: Herbicides produced a decrease in triglyceride levels only in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.140 mg triglycerides/g wet weight). In atrazine-exposed animals (\bar{x} all concentrations = 0.032 mg triglycerides/g wet weight), this reduction corresponded to 77%; in the glyphosate group (\bar{x} all concentrations = 0.048 mg triglycerides/g wet weight), 66%; and in the quinclorac group (\bar{x} = 0.039 mg triglycerides/g wet weight), 72%. There was no significant difference between the 7-day and 14-day control groups (Figure 3O).

Cholesterol: All herbicides produced a reduction in cholesterol levels in muscle tissue. Atrazine (\bar{x} all concentrations = 0.037 mg cholesterol/g wet weight) induced an 81% reduction in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.197 mg cholesterol/g wet weight) and a 76% reduction in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 0.153 mg cholesterol/g wet weight). In glyphosate-exposed animals (\bar{x} all concentrations = 0.048 mg cholesterol/g wet weight), the reduction was 76% in relation to the 7-day control group and 69% in relation to the 14-day control group. In the quinclorac group (\bar{x} all concentrations = 0.041 mg cholesterol/g wet weight), there was a 79% reduction in relation to the 7-day control group and a 73% reduction in relation to the 14-day control group. There was no significant difference between the control groups (Figure 3P).

Total Proteins: The total protein content of muscle tissue in animals exposed to atrazine (\bar{x} all concentrations = 0.191 mg protein/g wet weight) was 53% lower in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 0.411 mg protein/g wet weight) and 58% lower in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 0.451 mg protein/g wet weight). With glyphosate (\bar{x} all concentrations = 0.115 mg protein/g wet weight), the reduction was 72% as compared with the 7-day control group and 74% in relation to the 14-day

control group. With quinclorac (\bar{x} all concentrations= 0.128 mg protein/g wet weight), the reduction was 69% and 72% in relation to the 7-day and 14-day control groups respectively. The 14-day control group showed a 10% increase in muscle protein levels in relation to the 7-day control group (Figure 3Q).

Lipid Peroxidation: All herbicides were associated with a significant increase in lipid peroxidation in muscle tissue. In atrazine-exposed animals (\bar{x} all concentrations= 66 nmol TBARS/ mg protein), levels showed a 214% increase in relation to the 7-day control group (\bar{x} = 21 nmol TBARS/ mg protein) and a 500% increase in relation to the 14-day control group (\bar{x} = 11 nmol TBARS/ mg protein). In the glyphosate group (\bar{x} all concentrations= 129 nmol TBARS/ mg protein), levels increased 514% in relation to the 7-day control group and 1,072% in relation to the 14-day control group. As in other tissues, quinclorac (\bar{x} all concentrations= 148 nmol TBARS/ mg protein) appears to be have caused the most marked lipid peroxidation response, with exposed animals showing a 604% increase in levels in relation to 7-day controls and a 1,245% increase in relation to 14-day controls. There was no significant difference in lipid peroxidation levels between the two control groups (Figure 3R).

Weight, size and survival

All animals gained weight and increased in size during the experiment period. The weight gain observed in control groups 7 and 14 days was 22% and 18% respectively. In the atrazine group, the average weight gain was 14%; in the glyphosate group, 33%; and in the quinclorac group, 20% (Figure 4S). The increase in size was 2% and 10% in the 7-day and 14-day control groups respectively. In the atrazine group, the

average size increase was 20%; in the glyphosate group, 17%; and in the quinclorac group, 13% (Figure 4T).

Survival in the 7-day and 14-day control groups was 96% and 83% respectively. In the atrazine group, average survival was 91%; in the glyphosate group, 93%; and in the quinclorac group, 100%, i.e. there was no mortality in quinclorac-exposed animals (Figure 4U).

There was no significant variation in pH or in dissolved oxygen in water during the experiment period. Before the introduction of pesticides, aquarium water was approximately 7.2 in the control, atrazine, glyphosate, and quinclorac groups; after exposure, pH was approximately 7.3 in the glyphosate group and 7.4 in the control, atrazine, and quinclorac groups. Before introduction of the herbicides, the level of dissolved oxygen in water was 6.9 mg/L in the control and quinclorac aquariums, 6.8 mg/L in the atrazine aquariums, and 6.6 mg/L in the glyphosate aquariums. After addition of the herbicides to the water, the value of dissolved oxygen was 7.0 mg/L, 7.3 mg/L, 6.2 mg/L, and 6.6 mg/L in the control, atrazine, glyphosate, and quinclorac groups respectively.

Discussion

According to Alkahlen (1996), Ganeshwade (2012), and Salbego *et al.* (2010), non-target aquatic animals exposed to pesticides can bioaccumulate these toxic compounds in different tissues, which leads to damage, biochemical changes, and increased energy expenditure in an attempt to detoxify the agrochemical. We found similar response patterns in this study despite the use of very low concentrations of all tested herbicides.

The reductions in glycogen levels in the gills, liver and muscle and in the decrease in total lipid levels in the gills and muscle in the 14-day control group as compared with the 7-day control group may in fact be due to the availability of food. Unlike the patterns found in a frog farm, where animals are housed in large tanks and are fed *ad libitum*, all food was controlled in this experiment, leading to greater competition between individuals due to limited aquarium space and, consequently, to lower overall food intake.

In all tissues (gills, liver and muscle), glycogen levels were severely depleted after exposure to all herbicides and at all concentrations. These reductions accounted to a depletion of more than 90% of stores of this polysaccharide. A similar response in glycogen levels in tadpoles has been described by Ezemonye and Ilechie (2007) and Ezemonye and Tongo (2009) after exposure to the pesticides atrazine and basudin.

Glycogen plays an essential role in energy balance, as it provides a reserve of internal energy (Moyes and Schulte, 2010). Stressful situations during which homeostasis is threatened or disturbed, such as pesticide exposure, lead to induction of physiological responses (Barton and Iwama, 1991). Response to this stress consists of a rapid depletion of glycogen levels in order to meet increased energy demands and assist the metabolic processes involved in detoxification of pollutants (Alkahan, 1996). Furthermore, glycogen can also be used for synthesis of glycoproteins and glycolipids, which are essential constituents of the cell and its membranes (Vutukuru, 2005).

The cost of resistance to a toxic compound entails greater energy demand to repair the adverse effects caused by stress. To meet this increased energy demand, glycogen can be rapidly catabolized due to its easy availability to produce energy, thus producing massive depletion of tissue glycogen reserves (Becker *et al.*, 2009, Chang *et al.* 2006, Salbego *et al.*, 2010, Vutukuru, 2005).

In the gills, lipid levels decreased at all concentration of atrazine and quinclorac, but only at the highest concentration of glyphosate. In liver and muscle, the total lipid levels decreased after exposure to all herbicides, more markedly in these tissues than in the gills.

Lipids are the body's main source of energy. Lipids can act as a substrate for production of energy when extra fuel is required; they are released to meet the increased demand for energy induced by the stressor. Therefore, lipids play a vital role during biochemical adaptations of animals faced with stress conditions. Cells can oxidize fatty acids to increase energy production in response to increased demand, and lipids may be diverted to other metabolic functions essential to the survival of animals faced with a stressful situation (Champe *et al.*, 2006, Gijare *et al.*, 2011, Moyes and Schulte, 2010).

The decrease in total lipid levels observed in this study, particularly in liver and muscle, in tadpoles exposed to different concentrations of herbicides may also be related to the use of lipids in cell repair and in the organization of these tissues for the formation of lipoproteins, which are an important constituent of cell membranes and organelles.

According to Zaya *et al.* (2011), exposure to herbicides such as atrazine can increase energy demand and reduce lipid stores, altering metabolism and/or lipid mobilization in aquatic animals. This disruption in the lipid energy balance in tadpoles may be due to the massive energy required for detoxification and excretion of the herbicide. A similar decrease in lipid levels was also observed by Gurushankara (2007) and Honrubia *et al.* (1993) in adult frogs and in tadpoles after exposure to pesticides.

In our experiment, triglyceride levels decreased in the gills of animals exposed to lower concentrations of atrazine and to the highest concentration of quinclorac. In glyphosate-exposed animals, however, these levels increased at lower concentrations. In

liver and muscle tissue, triglyceride levels were reduced after exposure to all three herbicides in all concentrations.

The response pattern of lipid and triglyceride levels differed between the tissues studied in the present experiment. Gills exhibited low-intensity depletion of these energy reserves, probably to preserve their osmoregulatory and respiratory capacity.

Triglycerides constitute the main way of storing lipids, which play a vital role as energy reserves in animals (Moyes and Schulte, 2010). Exposure to toxic substances, such as pesticides, can cause harmful effects on living organisms and induce oxidation and alterations of the chemical function of triglycerides (El-Banna *et al.*, 2009). In situations of increased energy demand, animals can obtain energy through lipids stored as triglycerides (Landys *et al.*, 2005), and tadpoles seem to use lipids, especially stored triglycerides, as an endogenous energy source (Sawant and Varute, 1973).

The decrease in total lipid levels exhibited by *Rana perezi* tadpoles in response to pesticide exposure might affect triglyceride synthesis and may explain the reduction of these levels in animals exposed to atrazine and quinclorac (Honrubia *et al.* 1993). A similar strategy was probably verified in this study for the same pesticides, including glyphosate, in liver and muscle tissue of *Lithobates catesbeianus* tadpoles.

Yet another pathway of response to the stress of pesticide exposure involved increases in triglycerides levels, which may be due to an increase in food intake (Aldana-Madrid *et al.*, 2012, Montgomery *et al.*, 2008, Moyes and Schulte, 2010). Animals exposed to glyphosate showed this pattern in gill tissue and by increasing their weight more than other groups, including the control groups (Figure 1C and 4S).

The higher levels of triglycerides in the gills and decreased levels of triglycerides in other tissues in glyphosate-exposed animals may be attributable to

decreased oxygen consumption in an attempt at the maintenance of optimal gill function, thus reallocating energy to this vital organ of survival in aquatic animals, as a response to herbicide toxicity (Chang *et al.*, 2006). Păunescu and Ponopal (2011) reported increased triglyceride levels in adult frogs exposed to glyphosate.

In our experiment, only in the gills were cholesterol levels unchanged after herbicide exposure. In the liver and muscles, cholesterol levels decreased as compared to those of control animals. This pattern of change in cholesterol and triglyceride levels appears to reflect an attempt at preservation of gill function, thus ensuring the survival of animals due through a physiological adaptation to agrochemical exposure.

According to Champe *et al.* (2006) and Trabalon and Blais (2012), cholesterol plays an important role as a constituent of cell membranes, and its levels typically decrease after exposure to pesticides (Aldana-Madrid *et al.*, 2012). This decrease in cholesterol levels may be due to an inhibition of cholesterol biosynthesis or to use of fatty deposits as a source of energy in response to increased demands due to the stress caused by agrochemical exposure (Ganeshwade, 2012). A decrease in cholesterol levels also was observed by Shakoori *et al.* (1996) in fish exposed to pesticides. According to the author, this reduction in cholesterol levels may be due to utilization of fatty acid reserves for energy purposes.

Just as cholesterol levels, total protein concentrations in the gills were not significantly altered by exposure to herbicides. Conversely, in liver and muscle tissue, a decrease was evident after exposure to all three concentrations of atrazine, glyphosate, and quinclorac.

According to Salbego *et al.* (2010), exposure to herbicides can increase energy expenditure in an attempt at detoxification of these toxic compounds, thus altering metabolism and leading to low protein levels, which may indicate mobilization of

protein to increase its degradation into amino acids to feed the tricarboxylic acid cycle and increase ATP synthesis, thus satisfying the high energy demands of cells exposed to toxic stress (Ganeshwade, 2012).

A pattern of decrease in protein levels can indicate physiological acclimatization to high energy demands so as to compensate for the stress caused by pesticide exposure, or may reflect a mechanism of formation of lipoproteins, which will be used to repair damaged organelles, cells, and tissues (Rambabu and Rao, 1994, Ribeiro *et al.*, 2001, Sak *et al.*, 2006). Khan *et al.* (2003) and Sounderraj *et al.* (2011) also reported decreased protein levels in adult frogs after exposure to pesticides.

Although lipid peroxidation levels increased in response to exposure to all herbicides, at all concentrations, and in all tissues analyzed, quinclorac appears to be the most damaging of the three herbicides in this respect.

Lipid peroxidation, or oxidation of the lipid layer of the cell membrane, is one of the main mechanisms of cell injury, due to high concentration of polyunsaturated fatty acids in cells (El-Banna *et al.*, 2009). The oxidative destruction of lipids by means of lipid peroxidation appears to be an inevitable process in tissue injury (Al-Othman, 2011).

Animals exposed to pesticides can exhibit increased levels of lipid peroxidation in tissues, which can, in turn, lead to chemical damage and cell death (Al-Othman, 2011, Champe *et al.*, 2006, Uchendu *et al.*, 2012). According to Patil *et al.* (2009), pesticides have been shown to initiate and increase lipid peroxidation in biological membranes in experimental animals exposed to these chemicals, leading to changes in the function, structure and fluidity of cell membranes.

Some authors have reported increased lipid peroxidation in response to herbicide exposure. Modesto and Martinez (2010) and Lajmanovich (2010) reported

that exposure to glyphosate may increase lipid peroxidation in tadpoles; Kadry *et al.* (2012) reported increased lipid peroxidation in fish exposed to atrazine; and Menezes *et al.* (2012) noted that quinclorac can increase levels of lipid peroxidation in fish exposed to this pesticide.

It was found that although the levels of lipid peroxidation had strongly increased due to herbicides exposure, there wasn't a reduction in survival of these animals. This fact can be explained possibly by increased activity of antioxidant defenses and inhibition to the effects caused by increased lipid peroxidation, leading consequently to higher chances of survival of these individuals (Barreiros *et al.*, 2006; Blokhina *et al.*, 2003).

However, there have been few studies on increased lipid peroxidation in animals exposed to the herbicides tested herein, particularly quinclorac, which induced the most damage to lipid membranes in relation to the other two herbicides.

Although the present work was performed using concentrations of commercial formulations of atrazine, glyphosate, and quinclorac commonly found in natural water bodies, and these concentrations did not cause high mortality among exposed tadpoles, we found that all three herbicides can alter biochemical parameters and induce lipid peroxidation in these animals. The same pattern of response to exposure—an intense reduction in levels of all metabolites (glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol and total proteins) in liver and muscle - was observed with all three herbicides, although only glycogen and total lipid levels decreased in the gills, with changes in the other metabolites (triglycerides, cholesterol and total proteins) varying depending on the herbicide.

Such changes in the metabolism of tadpoles exposed to these pesticides may be linked to unsuccessful development, metamorphosis, and reproductive patterns in

amphibians. On the basis of these results, we suggest that increased use of agrochemicals may be an important factor in the decline of amphibian diversity and abundance worldwide.

Nevertheless, it bears stressing that this was the pattern of response exhibited by the species *Lithobates catesbeianus* under laboratory conditions. In the field, or in other species, response patterns may be distinct.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Taran Grant, Dr. Nelson Ferreira Fontoura, the team at the PUCRS Laboratory of Conservation Physiology, and CAPES for supporting this study.

References

- Al-Othman, A.M., Khaled, S.A., Gaber, E.E., Kareem, Y., Zeid, A. A., Mourad, A.M., John, P.G., 2011. Protection of α -tocopherol and selenium against acute effects of malathion on liver and kidney of rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5:10, 1263-1271.
- Aldana-Madrid, M.L., Shibayama, N., Calderon, M., Silva, A., Silveira-Gramont, M.I., Tsutsumi, V., Zuno-Floriano, F. G., Rincón-Sánchez, A. R., 2012. Hepatic effects from subacute exposure to insecticides in adult male wistar rats. In: Perven, F. (ed.) *Insecticides - advances in integrated pest management*, Intech: Rijeka, Croatia. 279-290.
- Alkahlen, H.F., 1996. Effects of lethal and sublethal concentrations of lindane on the behavior and energy reserves of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. *J. king. Saud. Univ.* 8:2, 153-164.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova.* 113-123.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review Fish Disease.* 10: 3-26.
- Becker, A.G., Moraes, B. S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldissotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silvercatfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72, 1734–1739.
- Berti, A.P., Düsman, E., Soares, L.C., Grassi, L.E.A., 2009. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. *Sabios: Rev. Saúde e Biol.* 4:1, 45-51.

- Blaustein, A.R., Johnson, P.T.J., 2003. The complexity of deformed amphibians. *Front Ecol Environ.* 1, 87–94.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91, 179-194.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipids peroxidation. *Methods Enzymology.* 52, 302-310.
- Carneiro, F.F., Pignati, W., Rigotto, R.M., Augusto, L.G.S., Rizollo, A., Muller, N.M., Alexandre, V.P., Friedrich, K., Mello, M.S.C., 2012. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, 1ª Parte. 98p.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 2006. Metabolismo dos lipídeos complexos e colesterol e metabolismo dos esteróides. In: Champe, P.C., Harvey, R.A. *Bioquímica Ilustrada.* 2ª ED. Porto Alegre: Artes Médicas. 199-242.
- Chang, C.C., Lee, P.P., Hsu, J.P., Yeh, S.P., Cheng, W., 2006. Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to shortterm trichlorfon exposure. *Aquaculture.* 253, 653–666.
- Coutinho, C.F.B., Tanimoto, S.T., Galli, G.S, Garbellini, G.S., Takayama, Do Amaral, R.B., Mazo, L.H., Machado, S.A.S., Avaca, L.A., 2005. Pesticidas: Mecanismo de Ação, Degradação e Toxidez. *Pesticidas: R.ecotológico. e meio ambiente, Curitiba*, 15: 65-72.
- Dörfler, U., Feicht, E.A., Scheunert, I.S., 1997. Triazine residues in groundwater. *Chemosphere.* 35, 99-106
- El-Banna, S.G., Attia, A.M., Hafez, A.A., El-Kazaz, S.A., 2009. Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/ antioxidant parameters in rat males exposed to chlorpyrifos. *Slovak J. Anim, Sci.* 42, 111-117.
- Ezemonye, L., Ilechie, I., 2007. Acute and chronic effects of organophosphate pesticides (basudin) to amphibian tadpoles (*Ptychadena bibroni*). *Afr. J. Biotech.* 6:11, 1554-1568.
- Ezemonye, L., Tongo, I., 2009. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. *Jordan Journal of Biological Sciences.* 2:1, 29-36.
- Fentem, J., Balls, M., 1993. Replacement of fish in ecotoxicology testing: use of bacteria, other lower organisms and fish cells in vitro. In: *Ecotoxicology Monitoring.* Mervyn Richardson. VCH, Weinheim, New York:71-81.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.A., 1957. Simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal Biological Chemistry.* 226, 497-509.
- Frings, C.E., Dunn, R. A., 1970. Colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology.* 53, 89-91.
- Galon L., Concenço, G., Ferreira, E.A., Silva, A.F., Ferreira, F.A., Noldin, J.A., Freitas, M.A.M., 2009. Competição entre plantas de arroz e biótipos de capim-arroz (*Echinochloa spp.*) resistente e suscetível ao quinclorac. *Planta Daninha.* 27, 701-709.
- Ganeshwade, R.M., 2012. Biochemical changes induced by dimethoate (Rogor 30% EC) in the gills of fresh water fish *Puntius ticto* (Hamilton). *J. Ecol. Nat. Environ.* 4:7, 181-185.
- Gijare, S.S., Raja, I.A., Tanatarpale, V.T., Kulkarni, K.M., 2011. Lipid changes in the freshwater fish *Ophiocephalus punctatus* exposed to synthetic pyrethroid cypermethrin. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* 4:1, 52-54.
- Gurushankara, H.P., Meenakumari, D., Krishnamurthy, S.V., Vasudev, V., 2007. Impact of malathion stress on lipid metabolism in *Limnonectes limnocharis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 88, 50–56.

- Honrubia, M.P., Herraiz, M.P., Alvarez, R., 1993. The carbamate insecticide azaphos(r) induced structural-changes of gills, liver, gallbladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles. Arch Environ Contam Toxicol. 25:2, 184-191.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbring, C.C. Werry, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. Environ. Toxicol. Chem., 23:1928-1938.
- IGC. Grain Market Report, October, 2012. International Grains Council (IGC), London, UK. N°. 427.
- Kadry, S.M., Marzouk, M.S., Amer, A.F., Hanna, M.I., Azmy, A.H., Hamed, H.S., 2012. Vitamin E as antioxidant in female African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish. 16:2, 83-98.
- Khan, M.Z., Tabassum, R., Naqvi, S.N.H., Shah, E Z., Tabassum, F., Ahmad, I., Fatima, F., Khan, M.F., 2003. Effect of cypermethrin and permethrin on cholinesterase activity and protein contents in *Rana tigrina* (amphibia). Turk. J. Zool. 27, 243-246.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabana, M.C., 2010. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: b-esterases and glutathion-s-transferase inhibitors. Archives in Environmental Contamination and Toxicology. 60, 681-689.
- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Hela, G.D., Albanis, T.A., 2002. Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the kalamas river (N.W. Greece). J. Chromatogr. 963, 107-116.
- Landis, W.G., Yu, M.H., 2003. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems: 3rd ed. Crc press. Boca Raton, Flórida. 509p.
- Landys, M.M., Piersma, T., Guglielmo, C.G., Jukema, J., Ramenofsky, M., Wingfield, J.C., 2005. Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. Proc. Roy Soc. B. 272, 295-302.
- Marchezan, E., Zanella, R., Avila, L.A., Camargo, E.R., Machado, S.L.O., Macedo, V.R.M., 2007. Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. Scientia Agricola. 64, 131-137.
- Menezes, C.C., Leitemperger, J., Santi, A., Lópes, T., Veiverberg, C.A., Peixoto, S., Adaim, M.B., Zanella, R., Barbosa, N.B.V., Loro, V.L., 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.
- Mídio, A.F., Martins, D.I., 1997. Herbicidas em alimentos: aspectos gerais, toxicológicos e analíticos. São Paulo: Livraria Varela. 109p.
- Modesto, K.A., Martinez, C., 2010. Effects of roundup transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere. 781-787.
- Montgomery, M.P., Kamel, F., Saldana, T.M., Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P., 2008. Incident Diabetes and Pesticide Exposure among Licensed Pesticide Applicators: Agricultural Health Study, 1993–2003. Am. J. Epidemiol. 167, 1235-1246.
- Moura, M.A.M., Franco, D.A.S., Matallo, M.B., 2008. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária. 142-151.
- Moyes, C.D., Schulte, P.M., 2010. Princípios De Fisiologia Animal. Porto Alegre: Artmed. 526-571.
- Oliveira JR., R.S., 2001. Mecanismos de ação de herbicidas. In: Oliveira Jr., R. S. Plantas daninhas e seu manejo. Maringá, Paraná: Napd – Um. 364p.

- Patil, J.A., Patil, A.J., Sontakke, A. V., Govindwar. S.P., 2009. Oxidative stress and antioxidants status of occupational pesticides exposed sprayers of grape gardens of western Maharashtra (India). *J. Environ Health Res.* 9:2, 81-89.
- Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 86, 1-7.
- Păunescu, A., Ponopal, C.M., 2011. Effect of Roundup® herbicide on physiological indices in marsh frog *Pelophylax ridibundus*. *Scientific Papers, Uasvm Bucharest.* 269-274.
- Poleza, F., Souza, R.C., Stramosk, C.A., Rorig, L.R., Resgalla Jr., C., 2008. Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *Vibrio fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande Do Sul. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente.* 18, 107-114.
- Rambabu, J.P., Rao, M.B., 1994. Effect of organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (muller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 142-148.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications.* 15:2, 618-627.
- Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 131-138.
- Sak, O., Uçkan, F., Ergin, E., 2006. Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Belg. J. Zool.* 136:1, 53-58.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contamin Toxicol.* 58:3, 740-5.
- Sawant, V.A., Varute, A.T., 1973. Lipid changes in the tadpoles of *Rana tigrina* during growth and metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 44, 729-750.
- Shakoori, A.R., Mughal, A.L., Iqbal, M.J., 1996. Effects of sublethal doses of fenvalerate (a synthetic pyrethroid) administered continuously for four weeks on the blood, liver and muscles of a freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 487-494.
- Silva, M.D., Peralba, M.C.R., Mattos, M.L.T., 2003. *Pesticidas. R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente.* 13-19.
- Silva, D.R.O., Avila, L.A., Agostinetto, D., Dal Magro, T., Oliveira, E., Zanella, R., Noldin, J.A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ci. Rural.* 39, 2383-2389.
- Sounderraj, S.F.L., Sekhar, P., Kumar, P.S., Lesley, N., 2011. Effect of systemic pesticide phosphamidon on haematological aspects of common frog *Rana tigrina*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives.* 2:6, 1776-1780.
- Spadotto, C.A., 2006. Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras. *Documentos, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente.* 58, 20p.
- Spadotto, C.A., Scorza Jr., R.P., Dores, E.F.G.C., Gebler, L., Moraes D.A.C., 2010. Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. *Documentos, Campinas, Embrapa Meio Ambiente.* 78, 47p.
- Trabalon, M., Blais, C., 2012. Juvenile development, ecdysteroids and hemolymph level of metabolites in the spider *Brachypelma albopilosum* (Theraphosidae). *J. Exp. Zool.* 317:236-247.
- Tomlin, C., 1994. *The pesticide manual - Incorporating the agrochemicals handbook – Tenth edition.* British Council: Cambridge/UK. 1341p.

Uchendu, C., Ambali, S.F., Ayo, J.O., 2012. The organophosphate, chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: a review. *Afr. J. Agric. Res.* 7:18, 2720-2728.

Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry.* 11, 256-265.

Vutukuru, S.S., 2005. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2, 456-462.

Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis.* 3rd ed. Prentice-Hall, London. 944p.

Zaya, R.M., Amini, Z., Whitaker, A.S., Kohler, S.L., Ide, C.F., 2011. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquat .Toxicol.* 104: 243-253.

GILLS

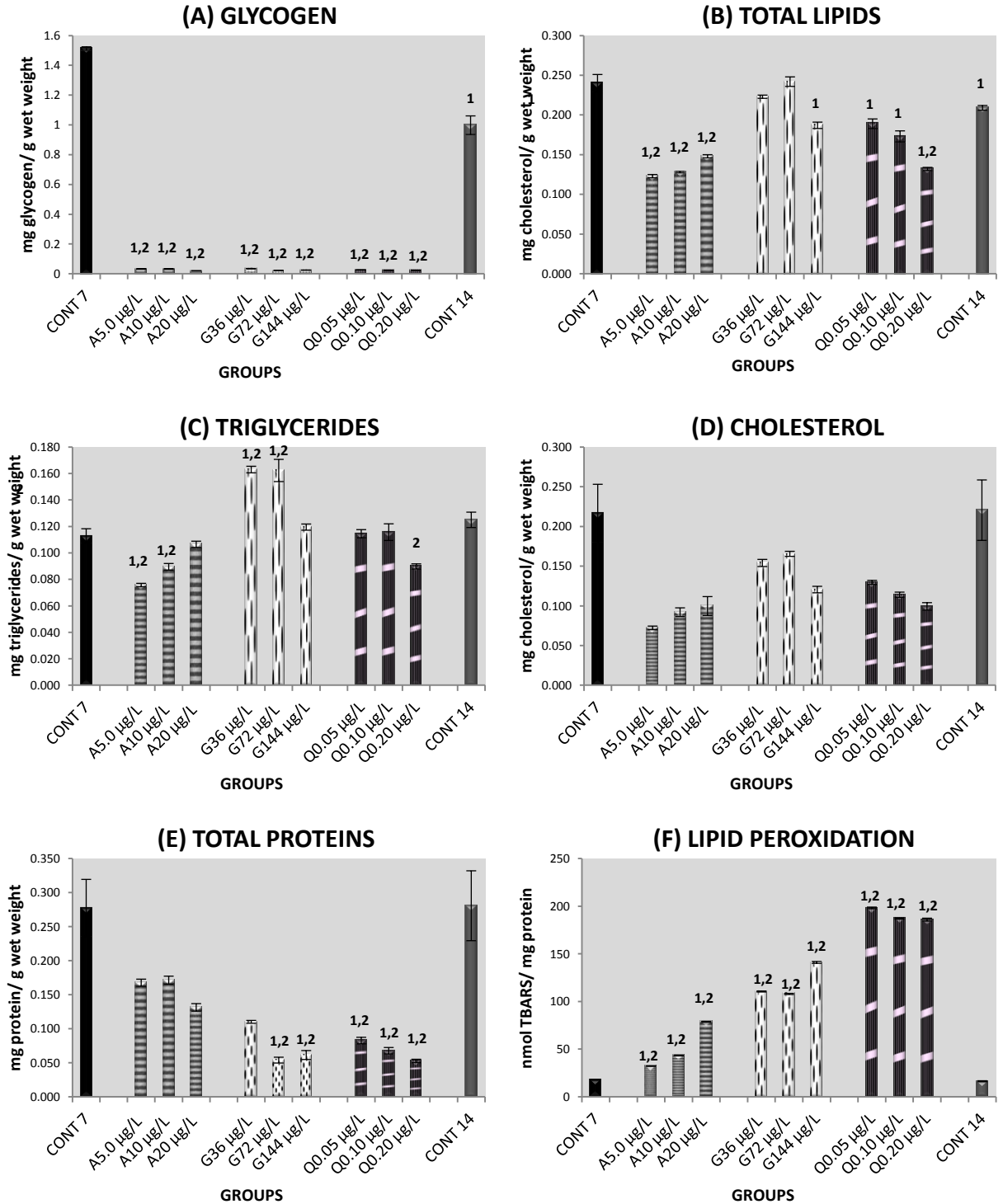


Figure 1: Graphics A, B, C, D, E, and F: Levels of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation in the gills of tadpoles of *Lithobates catesbeianus* exposed to different concentrations of herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac (Cont= Controls; A: Atrazine; G: Glyphosate; Q: Quinclorac). The results are expressed as the mean (\pm) standard error. The number 1 under the error bar represents a significant difference compared to the control group 7 days, and the number 2 represents this difference with respect to the control 14 days, $p < 0.05$.

LIVER

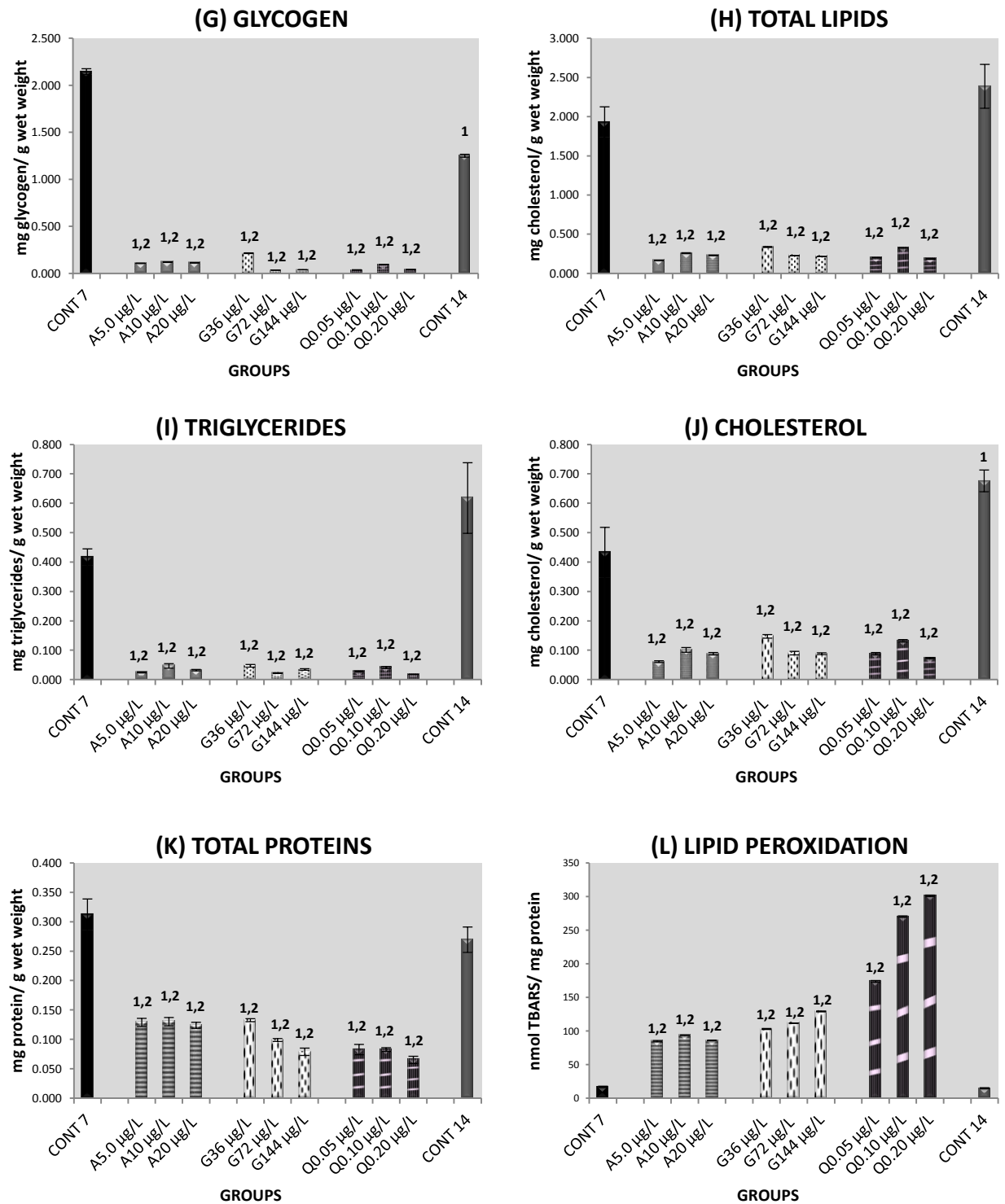


Figure 2: Graphics G, H, I, J, K, and L: Levels of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation in the liver of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to different concentrations of herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac (Cont= Controls; A: Atrazine; G: Glyphosate; Q: Quinclorac). The results are expressed as the mean (\pm) standard error. The number 1 under the error bar represents a significant difference compared to the control group 7 days, and the number 2 represents this difference with respect to the control 14 days, $p < 0.05$.

MUSCLE

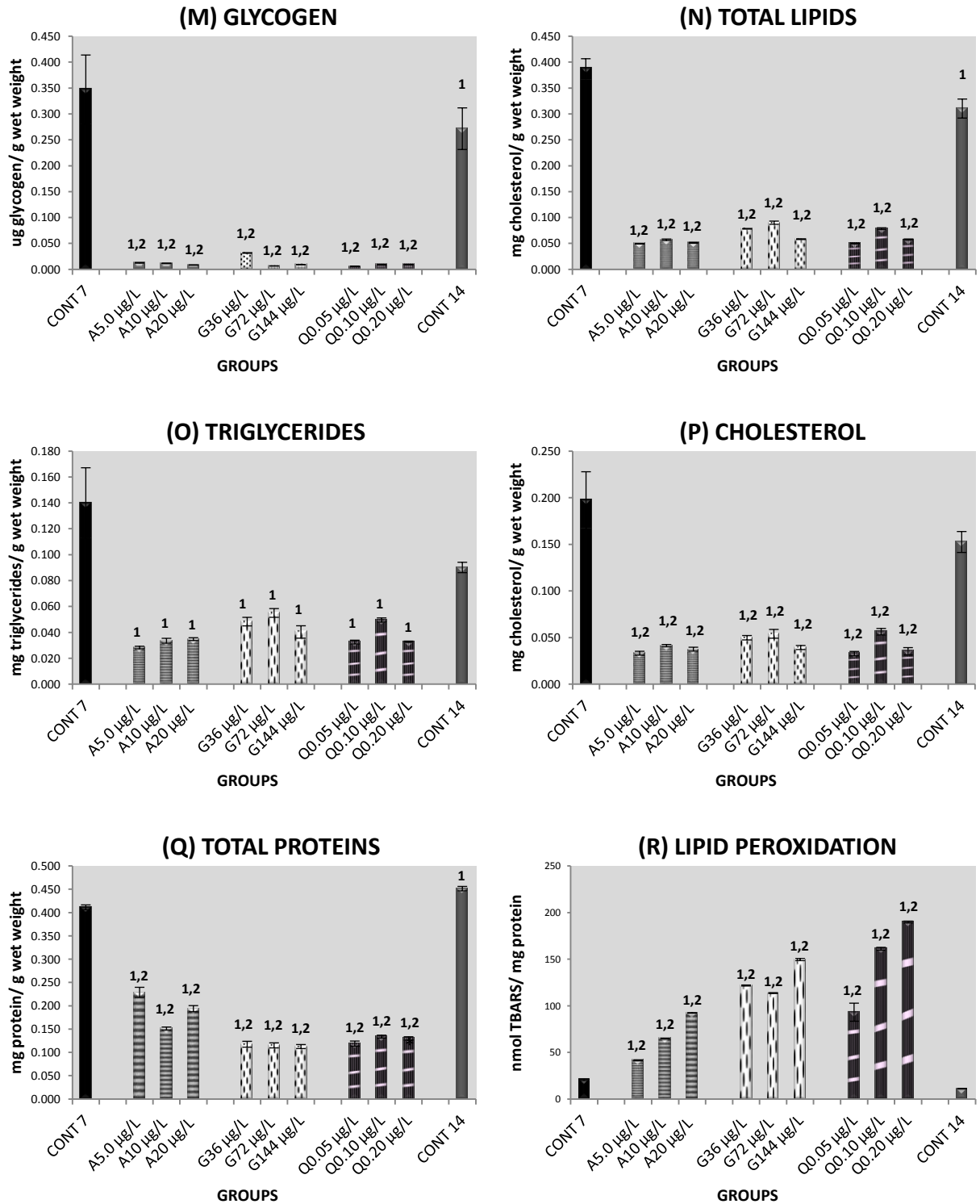
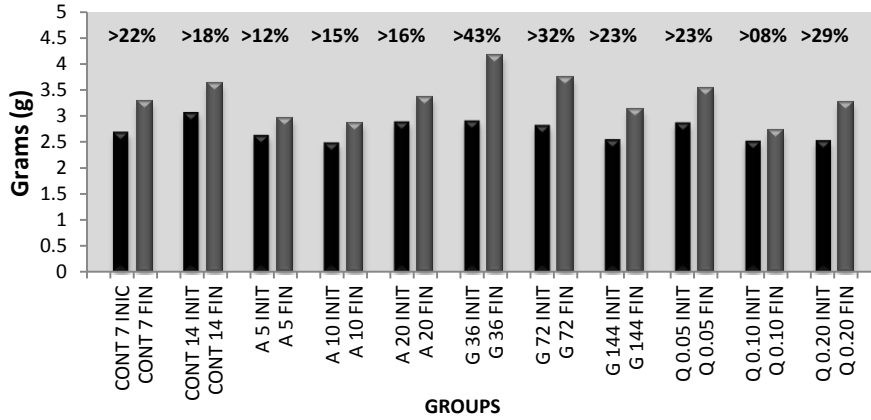


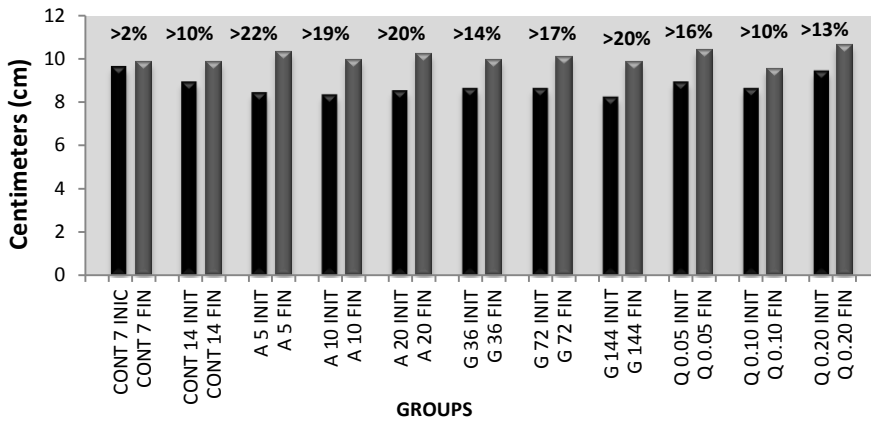
Figure 3: Graphics M, N, O, P, Q, and R: Levels of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation in the muscle of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to different concentrations of herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac (Cont= Controls; A: Atrazine; G: Glyphosate; Q: Quinclorac). The results are expressed as the mean (\pm) standard error. The number 1 under the error bar represents a significant difference compared to the control group 7 days, and the number 2 represents this difference with respect to the control 14 days, $p < 0.05$.

WEIGHT, SIZE AND SURVIVAL

(S) WEIGHT



(T) SIZE



(U) SURVIVAL

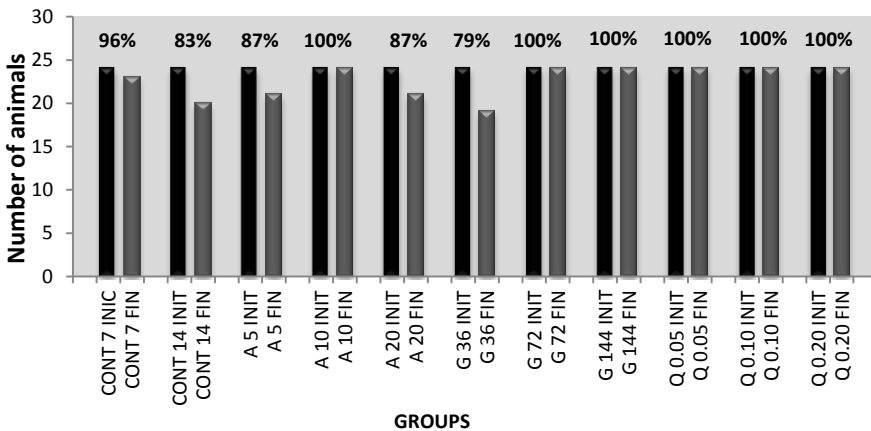


Figure 4: Graphics S, T, U: Weight gain during the experiment compared to the initial weight of the groups (the value on top of the bar indicates the percentage of weight gain), size at the beginning and end of the experiment (the value on top of the bar indicates the percentage of increase size during the experiment), and survival of tadpoles of *Lithobates catesbeianus* until the end of the experiment. (Cont= Controls A= Atrazine; G= Glyphosate; Q= Quinlorac).

ARTIGO

II

*“Evaluation of metabolic parameters and lipid peroxidation
in bullfrog tadpoles exposed to low concentrations
of atrazine, glyphosate and quinclorac”*

**EVALUATION OF METABOLIC PARAMETERS AND
LIPID PEROXIDATION IN BULLFROG TADPOLES
EXPOSED TO LOW CONCENTRATIONS OF
ATRAZINE, GLYPHOSATE, AND QUINCLORAC**

Dornelles, M.F.¹, Oliveira G.T.¹

¹ *Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação*

Correspondence to:

Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Faculdade de Biociências

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Laboratório de Fisiologia da Conservação

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250

CP. 1429

Porto Alegre, RS 90619-900

Brazil

Phone: 55-51-33203545 (ext. 8324)

Fax 55-51-3320-3612

E-mail: guendato@pucrs.br

Abstract

The way humans have used the world's natural resources has led to significant impacts on other species that inhabit the planet. Non-target aquatic organisms (such as tadpoles) can be indirectly affected by contaminants (such as pesticides). The present work sought to ascertain survival and possible changes in biochemical parameters (levels of glycogen, triglycerides, total lipids, cholesterol, protein, and lipid peroxidation) in the gills, liver, and muscle of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802) exposed to low concentrations (below legal limits) of the herbicides atrazine, glyphosate, and quinclorac. Tadpoles exposed to these herbicides showed a reduction of glycogen and triglyceride levels in all tissues, as well as an increase in lipid peroxidation, as compared with control animals. Total lipid content in the gills and muscle increased in animals exposed to atrazine, as did lipid levels in the gills alone in animals exposed to glyphosate, but decreased in the gills, liver, and muscle after quinclorac exposure. Cholesterol levels increased in the gills and liver after atrazine exposure and increased in the gills and muscle after glyphosate exposure, but decreased in liver tissue after quinclorac exposure. Total protein levels in the gills decreased after exposure to all herbicides, increased in muscle after atrazine exposure, and increased in the liver and muscle after exposure to quinclorac. These results reveal an imbalance in metabolic parameters in tadpoles exposed to these herbicides. This imbalance may be related to increased energy expenditure in these animals in an attempt to maintain homeostasis when faced with an agrochemical stressor. Our findings support the hypothesis that this biochemical unbalance may influence other biological parameters, such as development and reproductive success, or even lead to a decline in the population of amphibians exposed to these herbicides. However, further research is

required to determine conclusively if these results may be affecting other amphibian species and their life cycles.

Key Words

Amphibians, Agrochemicals, Biochemical changes, Bullfrog, Herbicides, Tadpoles.

1. Introduction

The way humans use the world's natural resources has led to significant impacts on other species that inhabit the planet. One example of this phenomenon is the decline in the number of amphibians over the last decades, an extinction that has no precedent in any animal class and which may be a result of the introduction of contaminants such as pesticides—even at low levels—into the environment (Allran and Karasov, 2000; Boone *et al.*, 2005; Gascon *et al.*, 2005; Sayim, 2008).

Approximately 1% of agrochemicals used in the field reach their specific targets. The other 99% can move through the different environmental compartments and may have an indirect effect on non-target organisms exposed to these contaminants (Belluck *et al.*, 1991).

Amphibians are among the animals that may be indirectly exposed to these agrochemicals, and this exposure may account for the great amphibial mortality that has been observed in recent years. Tadpoles appear to be more sensitive than adults, which

is consistent with the greater fragility of these animals in the larval stage (Johansson *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001).

The environmental changes induced by use of agricultural chemicals can interfere with physiological and biochemical parameters in non-target aquatic organisms, affecting functions such as growth, development, and reproduction (Upasani and Balaraman, 2001; Venkataramana *et al.*, 2006).

According to Massoud *et al.* (2011), there is a lack of data on the toxicity of pesticides at low concentrations, close to those found in the natural environment. Therefore, research on the impact of these contaminants in exposed communities of aquatic animals—even at low concentrations—is warranted.

Taking into account this lack of information about the interaction between herbicides at low concentrations and non-target aquatic animals, the present work sought to assess potential changes in biochemical parameters (levels of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total protein, and lipid peroxidation) and survival of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus* - Shaw, 1802) exposed to low concentrations (below legal limits) of the three herbicides most widely used on crops worldwide: atrazine, glyphosate, and quinclorac (Dörfler *et al.*, 1997; Miron *et al.*, 2004; Oga, 2003).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

For toxicity testing, we used three herbicides in concentrations below legal limits: atrazine (3 µg/L) (US Environmental Protection Agency, 1985) glyphosate (65 µg/L) (Brasil, 2005), and quinclorac. For the latter, we used a concentration below that

found in natural bodies of water (Marchezan *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009), considering that no specific legislation for maximum allowable concentrations in natural water bodies is available for this herbicide (Marchezan *et al.*, 2007). All pesticides were used as commercial formulations: atrazine, Primóleo® 400 g/L (Syngenta); glyphosate, Roundup Original® 306 g/L (Monsanto); and quinclorac, Facet® 500 g/Kg (BASF). The concentrations chosen for the present study were 2.5 µg/L for atrazine, 18 µg/L for glyphosate, and 0.025 µg/L for quinclorac.

2.2. Experimental model

For the purposes of this study, 76 bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles were acquired from a frog farm in the municipality of Imbé, state of Rio Grande do Sul, Brazil. All tadpoles were 3 months old and had no visible limbs, as recommended by Landis and Yu (2003).

The animals were transported in air-filled plastic bags to the Conservation Physiology Laboratory at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), where they were individually measured, weighed, and randomly divided into groups.

2.3. Experimental design

The experiment was conducted in duplicate: for each group, two aquariums containing the same number of individuals were used. For the control group, 16 animals were divided into two aquariums with 8 individuals each. In the herbicide exposure groups, allocation was as follows: 20 animals for atrazine (10 specimens in each aquarium), 20 animals for the glyphosate group (10 specimens in each aquarium), and 20 animals for the quinclorac group (10 specimens in each aquarium). All aquariums

contained 12L of water each, had constant aeration, a water temperature of around $22 \pm 2^\circ \text{C}$, pH 6.2 ± 0.3 , and a 12-hour light/dark cycle. The animals were fed (5% of the total biomass in each aquarium) once daily with the same fish feed used at the frog farm.

At the end of the experiment, all animals were euthanized by the freezing method, and the left and right gills, liver, and muscle were removed by dissection.

The total duration of the experiment was of 14 days: 7 days for acclimation and 7 days of exposure to herbicides. Herbicides were introduced in the aquariums on the eighth day after the beginning of the experiment - the commercial formulation, both as liquid (atrazine and glyphosate) or powder (quinclorac), were diluted in distilled water and added only once to the aquariums, in the concentrations to be used. In the control group, the animals remained for more 7 days under the same acclimation conditions.

All research protocols used in this work were authorized by the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Animal Research Ethics Committee with registration number CEUA 11/00250, as set forth in approval letter number 157/11-CEUA, December 2011.

2.4. Biochemical Analysis

All biochemical analyses of tissue specimens were performed, in quadruplicate, by spectrophotometric methods.

2.4.1. Glycogen

Extracted by Van Handel's method (1965) and quantified as glucose after acid hydrolysis (HCl) and neutralization (Na_2CO_3) (Geary *et al.*, 1981), using a commercial Glucose Oxidase Kit (Labtest). Results were expressed as mg/g.

2.4.2. Total Proteins

The total protein concentration was determined by the colorimetric biuret method: the sample is added to the reagent kit, vortexed, placed in a bath, cooled, and read in the spectrophotometer. Again, a commercial kit was used (Total Proteins Kit, Labtest) and results were expressed as mg/g.

2.4.3. Lipids, Triglycerides and Cholesterol

Extraction was by the chloroform: methanol method (2:1) (Folch et al., 1957). Lipid content was determined by the sulfo-phospho-vanillin reaction (Frings and Dunn, 1970), and triglycerides, by the lipoprotein lipase method, using the commercial Triglycerides GPO-ANA Kit (Bio-Diagnostic). Cholesterol was determined with the Liquiform Kit (Labtest). All results were expressed in mg/g.

2.4.4. Measurement of Lipid Peroxidation: Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)

TBA-RS (TBA-reactive substances) method: 150 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA), 50 µl of tissue homogenate, 100 µl of 0.67% thiobarbituric acid (TBA), and 50 µl of distilled water are added to a test tube (total volume: 350 µl). The tube is shaken, incubated at 100°C for 15 minutes, and cooled for 10 minutes. Then, 300 µl of n-butyl alcohol is added to the sample for extraction of the colored product from aqueous solution. Tubes are shaken for 45 seconds and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. The supernatant is added to the spectrophotometer cuvette and read at 535nm. Results are expressed as nmol/mg of protein.

2.5. Statistical analysis

Comparisons between the experimental and control group were made in the Statistical Package for Social Sciences 12.0 (SPSS) environment, using the Kolmogorov-Smirnov test for normality and Student's *t*-test for independent samples. The results were expressed as mean \pm standard deviation. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Gills

There were significant reductions in glycogen levels in the gills of animals exposed to atrazine ($\bar{x} = 0.044$ mg glycogen/g wet weight), glyphosate ($\bar{x} = 0.027$ mg glycogen/g wet weight), and quinclorac ($\bar{x} = 0.032$ mg glycogen/g wet weight) as compared with animals in the control group ($\bar{x} = 0.197$ mg glycogen/g wet weight) (Figure 1A). In comparison to the control group ($\bar{x} = 0.166$ mg cholesterol/g wet weight), total lipid levels were increased in animals exposed to atrazine ($\bar{x} = 0.539$ mg total lipids/g wet weight) and glyphosate ($\bar{x} = 0.511$ mg total lipids/g wet weight), but reduced in those exposed to quinclorac ($\bar{x} = 0.071$ mg total lipids/g wet weight) (Figure 1B). Triglyceride levels decreased in animals exposed to atrazine ($\bar{x} = 0.059$ mg triglycerides/g wet weight) and glyphosate ($\bar{x} = 0.134$ mg triglycerides/g wet weight) in relation to the control group ($\bar{x} = 0.232$ mg triglycerides/g wet weight) (Figure 1C). Cholesterol levels were increased in those exposed to atrazine ($\bar{x} = 0.238$ mg cholesterol/g wet weight) and glyphosate ($\bar{x} = 0.439$ mg cholesterol/g wet weight) as compared with control animals ($\bar{x} = 0.095$ mg cholesterol/g wet weight) (Figure 1D). Quinclorac exposure had no significant effect on triglyceride or cholesterol levels. Total

protein levels decreased in animals exposed to glyphosate (\bar{x} = 0.093 mg protein/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} = 0.091 mg protein/g wet weight) in relation to the control group (\bar{x} = 0.155 mg protein/g wet weight), but there was no significant difference in atrazine-exposed animals (Figure 1E). All herbicides increased lipid peroxidation levels in relation to the control group (\bar{x} = 9.025 nmol TBARS/ mg protein): levels were \bar{x} = 57.753 nmol TBARS/ mg protein in animals exposed to atrazine, \bar{x} = 47.601 nmol TBARS/ mg protein in those exposed to glyphosate, and \bar{x} = 57.849 nmol TBARS/ mg protein in those exposed to quinclorac (Figure 1F).

3.2. Liver

Statistically significant reductions in glycogen and triglyceride levels in the liver occurred in animals exposed to atrazine, glyphosate and quinclorac. Glycogen levels declined in animals exposed to atrazine (\bar{x} = 0.047 mg glycogen/g wet weight), glyphosate (\bar{x} = 0.047 mg glycogen/g wet weight), and quinclorac (\bar{x} = 0.057 mg glycogen/g wet weight) in relation to the control group (\bar{x} = 0.113 mg glycogen/g wet weight) (Figure 2G). Total lipid levels decreased after exposure to atrazine (\bar{x} = 0.429 mg total lipids/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} = 0.171 mg total lipids/g wet weight) in comparison to the control group (\bar{x} = 0.723 mg total lipids /g wet weight) (Figure 2H), but there was no significant difference in lipid levels after glyphosate exposure. Triglyceride levels declined after exposure to atrazine (\bar{x} = 0.263 mg triglycerides/g wet weight), glyphosate (\bar{x} = 0.229 mg triglycerides/g wet weight), and quinclorac (\bar{x} = 0.180 mg triglycerides/g wet weight) in relation to the control group (\bar{x} = 0.345 mg triglycerides/g wet weight) (Figure 2I). Atrazine exposure led to an increase in cholesterol levels (\bar{x} = 0.262 mg cholesterol/g wet weight), but animals exposed to glyphosate (\bar{x} = 0.032 mg cholesterol/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} = 0.053 mg

cholesterol/g wet weight) experienced a reduction in cholesterol levels as compared with controls (\bar{x} = 0.209 mg cholesterol/g wet weight) (Figure 2J). Total protein levels decreased in the glyphosate group (\bar{x} = 1.013 mg protein/g wet weight), but increased in the atrazine (\bar{x} = 1.683 mg protein/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} = 1.935 mg protein/g wet weight) groups in relation to the control group (\bar{x} = 1.454 mg protein/g wet weight) (Figure 2K). In the liver, as well as in the gills, all herbicides were associated with an increase in lipid peroxidation levels in relation to the control group (\bar{x} = 14.212 nmol TBARS/ mg protein): \bar{x} = 22.656 nmol TBARS/ mg protein in animals exposed to atrazine, \bar{x} = 22.419 nmol TBARS/ mg protein in those exposed to glyphosate, and \bar{x} = 23.855 nmol TBARS/ mg protein in those exposed to quinclorac (Figure 2L).

3.3. Muscle

In muscle tissue, there were statistically significant decreases in glycogen levels after exposure to glyphosate (\bar{x} = 0.007 mg glycogen/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} = 0.007 mg glycogen/g wet weight), but there was no significant decrease for atrazine in relation to the control group (\bar{x} = 0.009 mg glycogen/g wet weight) (Figure 3M). Total lipid levels increased after exposure to atrazine (\bar{x} = 0.075 mg total lipids/g wet weight), but decreased in animals exposed to glyphosate (\bar{x} = 0.006 mg total lipids/g wet weight) and quinclorac (\bar{x} = 0.004 mg total lipids/g wet weight) in relation to the control group (\bar{x} = 0.008 mg total lipids/g wet weight) (Figure 3N). Triglyceride levels decreased after exposure to atrazine (\bar{x} = 0.021 mg triglycerides/g wet weight), glyphosate (\bar{x} = 0.039 mg triglycerides/g wet weight), and quinclorac (\bar{x} = 0.058 mg triglycerides/g wet weight) in relation to the control group (\bar{x} = 0.139 mg triglycerides/g wet weight) (Figure 3O). Regarding cholesterol levels, only atrazine (\bar{x} = 0.030 mg cholesterol/g wet weight) was associated with a significant increase in relation to the control group (\bar{x} = 0.022 mg

cholesterol/g wet weight) (Figure 3P). All herbicides were associated with increases in total protein levels: \bar{x} = 0.424 mg protein/g wet weight after exposure to atrazine, \bar{x} = 0.391 mg protein/g wet weight after exposure to glyphosate, and \bar{x} = 0.525 mg protein/g wet weight after exposure to quinclorac, versus \bar{x} = 0.258 mg protein/g wet weight in the control group (Figure 3Q). As in the gills and the liver, lipid peroxidation levels in muscle tissue increased after exposure to herbicides in relation to the control group (\bar{x} = 20.543 nmol TBARS/ mg protein): levels were \bar{x} = 55.646 nmol TBARS/ mg protein after atrazine exposure, \bar{x} = 69.186 nmol TBARS/ mg protein after glyphosate exposure, and \bar{x} = 52.411 nmol TBARS/ mg protein after quinclorac exposure (Figure 3R).

3.4. Weight, Size, and Survival

All animals experienced increases in weight (Figure 4S) and size (Figure 4T) during the experiment. There was no mortality (Figure 4U), even among the animals exposed to herbicides.

4. Discussion

Nwani *et al.* (2010) and Roy and Hänninen (1993) report that the indiscriminate use of herbicides may have harmful effects on aquatic organisms, possibly leading to sublethal effects, such as biochemical and metabolic changes in the tissues of exposed animals. According to Johansson *et al.* (2006), exposure to pesticides at levels as low as those found in nature usually does not cause mortality.

Our findings were consistent with the hypothesis of that there was no mortality after exposure to herbicides, as well there was no significant change in weight gain and

growth of these animals, however, changes occurred in tissue biochemical parameters, despite the very low concentrations of herbicides that tadpoles were exposed.

Pollutants such as herbicides are environmental stressors, and can induce an adaptive response in exposed animals due to changes in their metabolic balance, thus producing a physiological response in an attempt by the animal to reestablish homeostasis (Roy and Hänninen, 1993; Sasikala *et al.*, 2011; Wendelaar Bonga, 1997).

The responses induced by this stress can occur as a result of metabolic changes, due to an increase in metabolic processes and a consequent increase in energy expenditure as a function of the stressor (Weissman, 1990).

According to Oba *et al.* (2009), some animals' responses to exposure to chemicals, such as pesticides, can include a variety of metabolic changes: mobilization of energy substrates, as expressed by depleted glycogen stores; lipolysis; inhibition of protein synthesis; increased muscle protein catabolism; and changes in levels of fatty acids and cholesterol.

The decrease in glycogen concentrations in all tissues observed after exposure to the three tested herbicides is an expected response and similar to that found by other researchers. This response may be due to the fact that pesticides usually affect energy metabolism, leading to an increase in energy expenditure, and glycogen can act as a rapid source of fuel—through the mobilization of stored glycogen—in times of stress exposure (Oba *et al.*, 2009; Triebkorn *et al.*, 1998; Venkataramana, 2006; Weissman, 1990).

Glycogen serves a protective function during periods of high energy demand, acting as an immediately accessible energy reserve. The observed increases in energy requirement are probably linked to a metabolic adjustment expressed by increased mobilization of glycogen (Dua *et al.*, 2010; Tiwari and Singh, 2003).

The effects of some pesticides on the lipid profile may be more pronounced in the skeletal muscles and liver, and can cause a decrease in tissue lipid levels (Adamu and Kori-Siakpere, 2011; Triebskorn et al., 1998).

In our experiment, we observed a reduction in lipid levels in the liver after exposure to all herbicides, and in the muscle after exposure to glyphosate and quinclorac, which may suggest mobilization of stored lipids, a common response in cases of exposure to chemical stressors (Adamu and Kori-Siakpere, 2011). No such response was seen in gills or muscle after exposure to atrazine, nor in the gills after exposure to glyphosate.

Little information is available about the effects of pesticides on lipid metabolism, but it is known that the liver is the site of intermediary metabolism of lipids and energy, and may play a central role in the adaptive response by changing metabolic pathways and fatty acid synthesis (Lasram *et al.*, 2009). This hypothesis is reinforced by the reduction in glycogen, lipid, and triglycerides reserves in the hepatic tissue of animals exposed to herbicides—and the reduction of protein levels in tadpoles exposed to glyphosate—in this study.

Fat can be used as a source of energy or stored. After a stressful event, fat is used as the primary fuel source, in a process whereby triglycerides are metabolized into fatty acids and glycerol and then metabolized as fuel (Weissman, 1990).

Some authors, such as Weissman (1990), have shown that aquatic animals can alter their cholesterol levels in response to pesticide exposure. Cholesterol levels may increase due to the stress induced by exposure to these agents, indicating an induced chemical disruption of lipid metabolism. The hypercholesterolemia observed in frogs exposed to pesticides can be the result of a decrease in the ratio of cholesterol conversion to bile acids, or an impaired liver function. Conversely, pesticide exposure

also can decrease cholesterol levels, leading to an increase in food intake (Adamu and Kori-Siakpere, 2011; Sounderraj *et al.*, 2011). In this study, cholesterol levels were altered in different ways in different types of tissue.

Aldana-Madrid *et al.* (2012) observed a compensatory mechanism to pesticide exposure whereby exposed animals decrease their cholesterol levels while increasing triglycerides levels. In our study, we found the opposite response, namely a decrease in triglyceride levels and an increase in cholesterol levels in gills and muscle. Both triglyceride and cholesterol levels decreased in the liver, which suggests that the tested pesticides can also cause liver damage.

Proteins can also be involved in compensatory mechanisms in response to animal stress. The reduction in protein levels in the gills observed after exposure to all herbicides, as well as the reduction in liver protein levels after exposure to glyphosate, suggests that this decline in protein content can be due to a reduction in protein synthesis, an increase in proteolysis, and use of proteins for metabolic processes in response to pesticides toxicity. These reductions in tissue protein content suggest that some pathway has been triggered in an attempt to restore depleted energy by breaking down protein to yield energetic fuel (Adamu and Kori-Siakpere, 2011; Kahn *et al.*, 2002; Susan, 2010; Tiwari and Singh, 2003; Venkataramana, 2006).

However, other responses can occur in the liver and muscle of aquatic animals exposed to pesticides, such as an increase in levels of protein. This may be due to a decrease in protein catabolism and/or to an increase in protein synthesis, as verified by Sahib *et al.* (1984) in the tissues of fish exposed to malathion. A similar response was observed in muscle tissue of tadpoles exposed to all herbicides (atrazine, glyphosate, and quinclorac) and in the liver of animals exposed to atrazine and quinclorac in the present study.

Unlike suggested by Becker et al. (2009), the pattern of glycogen response to herbicide exposure was the same in all tissues and with all three herbicides, which demonstrates the importance of this polysaccharide for energy homeostasis and survival in these animals. The other metabolites analyzed showed different responses depending on tissue and pesticide.

The intense depletion of energy reserves observed in this study may be associated with the rate of survival of tadpoles exposed to low concentrations of the tested herbicides (atrazine, glyphosate, and quinclorac) (Figure 4U).

Lipid peroxidation can provide important evidence of the toxicity of environmental pollutants. In this study, we observed an increase in lipid peroxidation levels after exposure to all herbicides and in all tissues analyzed. These responses were more marked in gill tissue (5.2-fold to 6.3-fold increases) than in muscle (2.7-fold to 3.4-fold increases) and liver (1.6-fold increase). Despite the increase in the lipid peroxidation levels, there wasn't observed a mortality increased in these animals, which may be related to an antioxidant defence capacity both in enzymatic as in non-enzymatic terms (Ballesteros *et al.*, 2009).

Farombi *et al.* (2008), Gultekin *et al.* (2000) and Brocardo *et al.* (2005) found similar results in their investigations, and reported that animals can exhibit increased levels of lipid peroxidation in response to pesticide exposure, which may indicate oxidative tissue damage.

Organisms respond to changes in the external environment by stabilizing their physiological mechanisms of homeostasis. In complex animals, homeostasis is maintained particularly in organs that serve as sites of exchange with the external environment, such as the gills (Hickman *et al.*, 2001). As the gills are the first tissue to be exposed in amphibians, greater uptake of pesticides may occur and the response to

exposure may be more intense in this organ (Streit, 1992). The results of the present study reinforce this hypothesis, as glycogen, triglyceride, and total protein levels in gill tissue decreased and lipid peroxidation was markedly increased in response to all pesticides.

In aquatic animals, responses to stress are an adaptive mechanism that allows survival in the presence of stressors by maintenance of homeostasis. These responses can occur at the tissue level, which includes the mobilization of energy substrates. Depending on the intensity of the stressor, animals may be unable to tolerate the ensuing changes and exhibit reactions such as inhibition of growth, reproduction, or immune response (Lima *et al.*, 2006).

Although there has been much research on exposure of frogs to the herbicides atrazine, glyphosate, and quinclorac, these investigations have focused on behavioral effects, morphological deformities, and changes in the developmental stages; little research has focused on biochemical alterations in these animals. However, some work on biochemical changes in tadpoles exposed to atrazine has been carried out by such authors as Ezemonye and Tongo (2009), Langerveld *et al.*, (2009) and Zaya *et al.* (2011), whereas Costa *et al.* (2008), Howe *et al.* (2004) and Păunescu and Ponopal (2011) have assessed the effects of glyphosate. We were unable to find any similar research involving quinclorac, however.

It is important to stress that the responses found in this and the aforementioned studies may differ depending on the species of animal, concentration of herbicide, and duration of exposure to the contaminant.

5. Conclusions

The low concentrations of atrazine, glyphosate, and quinclorac used in this study had no effect on mortality, weight gain, or size in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to these herbicides for 7 days. However, even at low concentrations, these herbicides induced alterations in biochemical parameters and in levels of lipid peroxidation. This imbalance in metabolic parameters may be linked to increased energy expenditure in these animals in an attempt to maintain homeostasis despite the presence of an agrochemical stressor. These findings support the hypothesis that this biochemical imbalance may influence other biological parameters, such as development and reproductive success, and may even lead to a decline in amphibian populations exposed to the tested herbicides. However, further research is required to determine whether similar responses may affect other amphibian species.

6. Appendices

Figure 1: Graphics A, B, C, D, E and F: Levels of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation in the gills of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac, (Co 7= Control 7 days; A 2.5= Atrazine 2.5 µg/L ; G 18= Glyphosate 18 µg/L ; Q 0.025= Quinclorac 0.025 µg/L). The results are expressed as the mean (\pm) standard deviation. The asterisk beside the bars indicates a significant difference compared to the control group 7 days, being $p < 0.05$.

Figure 2: Graphics G, H, I, J, K and L: Levels of glycogen, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation in the liver of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac, (Co 7= Control 7 days; A 2.5= Atrazine 2.5 µg/L ; G 18= Glyphosate 18 µg/L ; Q 0.025= Quinclorac 0.025 µg/L). The results are expressed as the mean (±) standard deviation. The asterisk beside the bars indicates a significant difference compared to the control group 7 days, being $p < 0.05$.

Figure 3: Graphics M, N, O, P, Q and R: Glycogen levels, total lipids, triglycerides, cholesterol, total proteins, and lipid peroxidation in the muscle of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac, (Co 7= Control 7 days; A 2.5= Atrazine 2.5 µg/L ; G 18= Glyphosate 18 µg/L ; Q 0.025= Quinclorac 0.025 µg/L). The results are expressed as the mean (±) standard deviation. The asterisk beside the bars indicates a significant difference compared to the control group 7 days, being $p < 0.05$.

Figure 4: Graphics S, T and U: Weight gain during the experiment compared to the initial weight of the groups (the value beside the bar indicates the percentage of weight gain), size at the beginning and end of the experiment (the value beside the bar indicates the percentage of increase size during the experiment), and survival of *Lithobates catesbeianus* tadpoles until the end of the experiment (the value beside the bar indicates the percentage of survival). (Co 7= Control 7 days; A 2.5= Atrazine 2.5 µg/L ; G 18= Glyphosate 18 µg/L ; Q 0.025= Quinclorac 0.025 µg/L; INIT= Initial; FIN= Final).

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Taran Grant, Dr. Nelson Ferreira Fontoura, the team at the PUCRS Conservation Physiology Laboratory, and CAPES for supporting this study.

References

- Adamu, K. M., Kori-Siakpere, O., 2011. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on some biochemical parameters of hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchius Bidorsalis*). Braz. Arch. Biol. Technol., 54, 183-196.
- Aldana-Madrid, M. L., Shibayama, N., Calderon, M., Silva, A., Silveira-Gramont, M. I., Tsutsumi, V., Zuno-Floriani, F. G., Rincón-Sánchez, A. R., 2012. Hepatic effects from subacute exposure to insecticides in adult male wistar rats. In: Perven, F. (ed.) Insecticides – advances in integrated pest management, Intech: Rijeka, Croatia, 279-290.
- Allran, J. W., Karasov, W. H., 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in laboratory from posthatch through metamorphosis. Environ. Toxicol. Chem., 19:11, 2850–2855.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. Ecotoxicol. Environ. Safety, 72, 199-205.
- Becker, A. G., Moraes, B. S., Menezes, C. C., Loro, V. L., Santos D. R., Reichert, J. M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alter the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72:6,1734-1739.
- Belluck, D. A., Benjamin, S. L., Dawson, T., 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: Risk assessment, policy, and legal implications IN: pesticide transformation products: Fate and significance in the environment. ACS Symposium Series 459. American Chemical Society, Washington, DC. 254-273.
- Brocardo, P. S., Pandolfo, P., Takahashi, R. N., Rodrigues, A. L. S., Dafre, A. L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. Toxicology, 207, 283-291.
- Buege, J. A., Aust, S. D., 1978. Microsomal lipids peroxidation. Methods of Enzymology. 52,302-310.
- Boone, M. D., Cowman, D., Davidson, C., Hayes, T., Hopkins, W., Relyea, R., Schiesari, L., Semlitsch, R., 2005. Evaluating the role of environmental contamination in amphibian population declines. In: Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E., Mendelson III, J. R. Ed., 2005. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland, 32-35.
- Brasil, conselho nacional do meio ambiente, 2005. Resolução n.º 357, de 17/3/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
- Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T., Kalinin, A. L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup original. Ecotoxicol. 17, 153–163.

- Dua, R., Kumar, V., Sunkaria, A., Gill, K. D., 2010. Altered glucose homeostasis in response to aluminium phosphide induced cellular oxygen deficit in rat. *Indian J. Exp. Biol.*, 722-730.
- Dörfler, U., Feicht, E. A., Scheunert, I. 1997. S-triazine residues in groundwater. *Chemosphere*, 35, 99-106.
- Ezemonye, L., Tongo, I., 2009. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2:1, 29-36.
- Farombi, E. O., Ajimoko, Y. R., Adelowo, O. A., 2008. Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water african catfish, (*Clarias gariepinus*). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 5:5, 423-427.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. A., 1957. Simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal Biological Chemistry*. 226, 497-509.
- Frings, C. E., Dunn, R. A., 1970. Colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology*. 53, 89-91.
- Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E., Mendelson III, J. R. Ed., 2005. *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland, 68p.
- Geary, N., Langhans, W., Scharrer, E., 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.* 241, 330-335.
- Gultekin, F., Ozturk, M., Akdogan, M., 2000. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Arch Toxicol* 74, 533-538.
- Hickman, Jr., C. P., Roberts, L., Larson, A., 2001. Homeostasis, osmotic regulation, Excretion, and temperature regulation. In: Hickman, Jr., C. P., Roberts, L., Larson, A., 2001. *Integrated principles of zoology* - 11th ed. 664-683.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbring, C. C., Werry, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity of glyphosatebased pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:1928-1938.
- Johansson, M., Piha, H., Kylin, H., Merilla, J., 2006. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3164-3169.
- Khan, M. Z., Farina, F., Imtiaz, A., 2002. Effect of Cypermethrin on Protein contents in Lizard *Calotes versicolor* in comparison to that in Frog *Rana tigrina*. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 2:12, 780-781.
- Landis, W. G., Yu, M. H., 2003. *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*: 3rd ed. Crc press. Boca Raton, Flórida. 509p.
- Langerveld, A. J., Celestine, R., Zaya, R., Mihalko, D., Ide, C. F., 2009. Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related unctions in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research*, 379-389.
- Lasram, M. M., Annabi, A. B., Elj, N., E., Selmi, S., Kamoun, A., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2009. Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 1052-1055.
- Lima, L. C., Ribeiro, L. P., Leite, R. C., Melo, D. C., 2006. Estresse em peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 30, 113-117.
- Marchezan, E., Zanella, R., Avila, L. A., Camargo, E. R., Machado, S. L. O., Macedo, V. R. M., 2007. Rice herbicide monitoring in two brazilian river during the rice growing season. *Scientia Agricola*, 64,131-137.

Massoud, A. S. D. A. H., El-Fakhrany, I. I., Allah, M. S. S., 2011. Toxicological effects of organosphorus insecticides and remediation technologies of its residues in aquatic system B. dimethoate. J. Agric. Res. Kafer El-Sheikh Univ., 37(3), 516-533.

Miron, D. S., Da Silva, L. V. F., Golombieski, J. I., Machado, S. L. O., Marchezan, E., Baldissotto, B., 2004. Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. Ci. Rural, Santa Maria, 34:5, 1465-1469.

Murphy, J. E., Phillips, C. A., Beasley, V. R., 2000. Aspects of amphibian ecology. In: Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A. Eds. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Setac Press, Pensacola, FL, 141-178.

Nwani, C. D., Lakra, W. S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S. K., 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). Int J Environ Res Public Health, 8, 3298-3312.

Oba, E. T., Mariano, W. S., Santos, L. R. B., 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo sustentável. In: Tavares-Dias, M. (Org). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Macapá: Embrapa Amapá. 389-424.

Oga, S., 2003. Fundamentos De Toxicologia, 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 474p.

Păunescu, A., Ponepal, C. M., 2011. Effect of roundup® herbicide on physiological indices in marsh frog *Pelophylax ridibundus*. Scientific Papers, Uasvm Bucharest., 269-274.

Roy, S., Hänninen, O., 1993. Biochemical monitoring of the aquatic environment: possibilities and limitations. In: M. Richardson (Ed.), Ecotoxicology monitoring, VCH-Verlag, 119-135.

Sahib, I. K., Rao, K. R., Rao, K. V., 1984. Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters), as measured through incorporation of [¹⁴C] amino acids. Toxicol Lett. 20:1, 63-67.

Sasikala, G., Palanisamy, P., Mallikaraj, D., Bhuvaneshwari, N., Natarajan, G. M., 2011. Biochemical modulations induced by metasystox in fresh water snakeheaded fish *Channa striata* blood. Int J Pharm Biol Arch., 2:2, 772-774.

Sayim, F., 2008. Acute toxic effects of malathion on the 21st stage larvae of the marsh frog. Turk J Zool, 99-106.

Silva, D. R. O., Avila, L. A., Agostinetto, D., Dal Magro, T., Oliveira, E., Zanella, R., Noldin, J. A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. Ci. Rural. 39, 2383-2389.

Sounderraj, S. F. L., Sekhar, P., Kumar, P. S., Lesley, N., 2011. Effect of systemic pesticide phosphamidon on haematological aspects of common frog *Rana tigrina*. I Int J Pharm Biol Arch., 2:6, 1776-1780.

Streit, B., 1992. Bioaccumulation processes in ecosystems. Experientia, 48, 955-970.

Susan, T. A., Sobha, K., Veeraiah, K., Tilak, K. S., 2012. Studies on biochemical changes in the tissues of *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala* exposed to fenvalerate technical grade. J. Toxicol. Environ. Health Sci., 2:5, 53-62.

Tiwari, S., Singh, A., 2003. Control of common freshwater predatory fish, *Channa punctatus*, through *Nerium indicum* leaf extracts. Chemosphere, 53, 865-875.

Triebkorn, R., Christensen, K., Heim, G., 1998. Effects of orally and dermally applied metaldehyde on mucus cells of slugs (*Deroceras reticulatum*) depending on temperature and duration of exposure. J. Mollus. Stud. 64:4, 467-487.

- Upasani, C., D., Balaraman, R., 2001. Effect of vitamin e, vitamin c and spirulina on the levels of membrane bound enzymes and lipids in some organs of rats exposed to lead. *Indian J. of Pharmacology*, 33, 185-191.
- US Environmental Protection Agency, 1985. EPA draft final list of recommendation for chemicals in the National Survey for Pesticides in Groudwater. *Chem. Regul. Rep.*, 9, 1033.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Anal. Biochem.*, 11, 256-265.
- Venkataramana, G. V., Sandhya Rani, P. N., Murthy, P. S., 2006. Impact of malathion on the biochemical parameters of gobiid fish, *Glossogobius giuris* (Ham). *J. of Environ. Biology*, 27:1, 119-122.
- Wang, X., Dong, Y., Wang, L., Han, S., 2001. Acute toxicity of substituted to *Rana japonica* tadpoles and mechanism –based quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *Chemosphere*, 44, 447-455.
- Weissman, C., 1990. The metabolic response to stress: an overview and update. *Anesthesiology*, 73, 308-27.
- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Phy. Reviews*, 77:3, 592-625.
- Zaya, R. M., Amini, Z., Whitaker, A. S., Kohler, S. L., Ide, C. F., 2011. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquat Toxicol.* 104: 3-4, 243-253.

GILLS

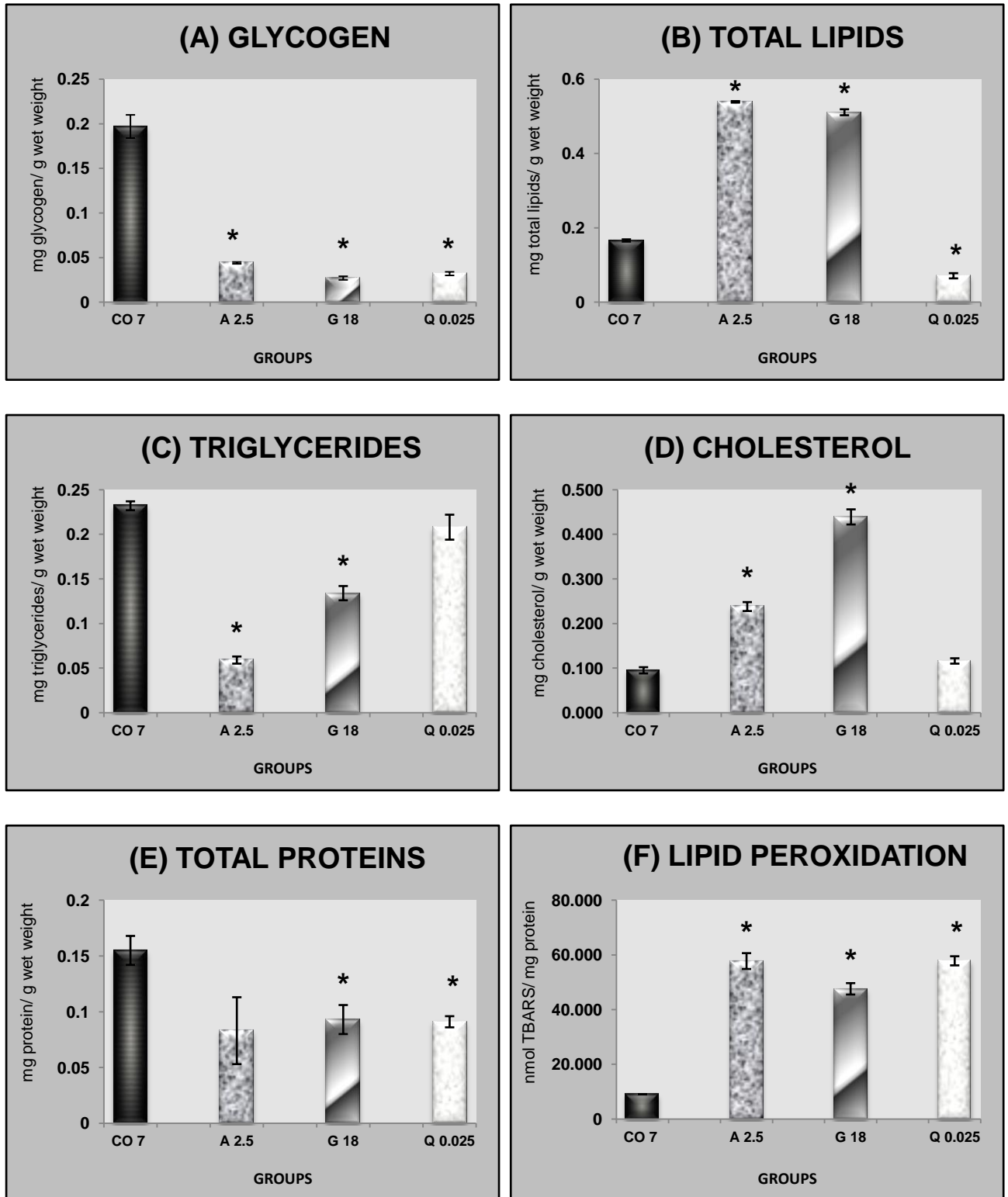


Figure 1: Graphics A, B, C, D, E and F.

LIVER

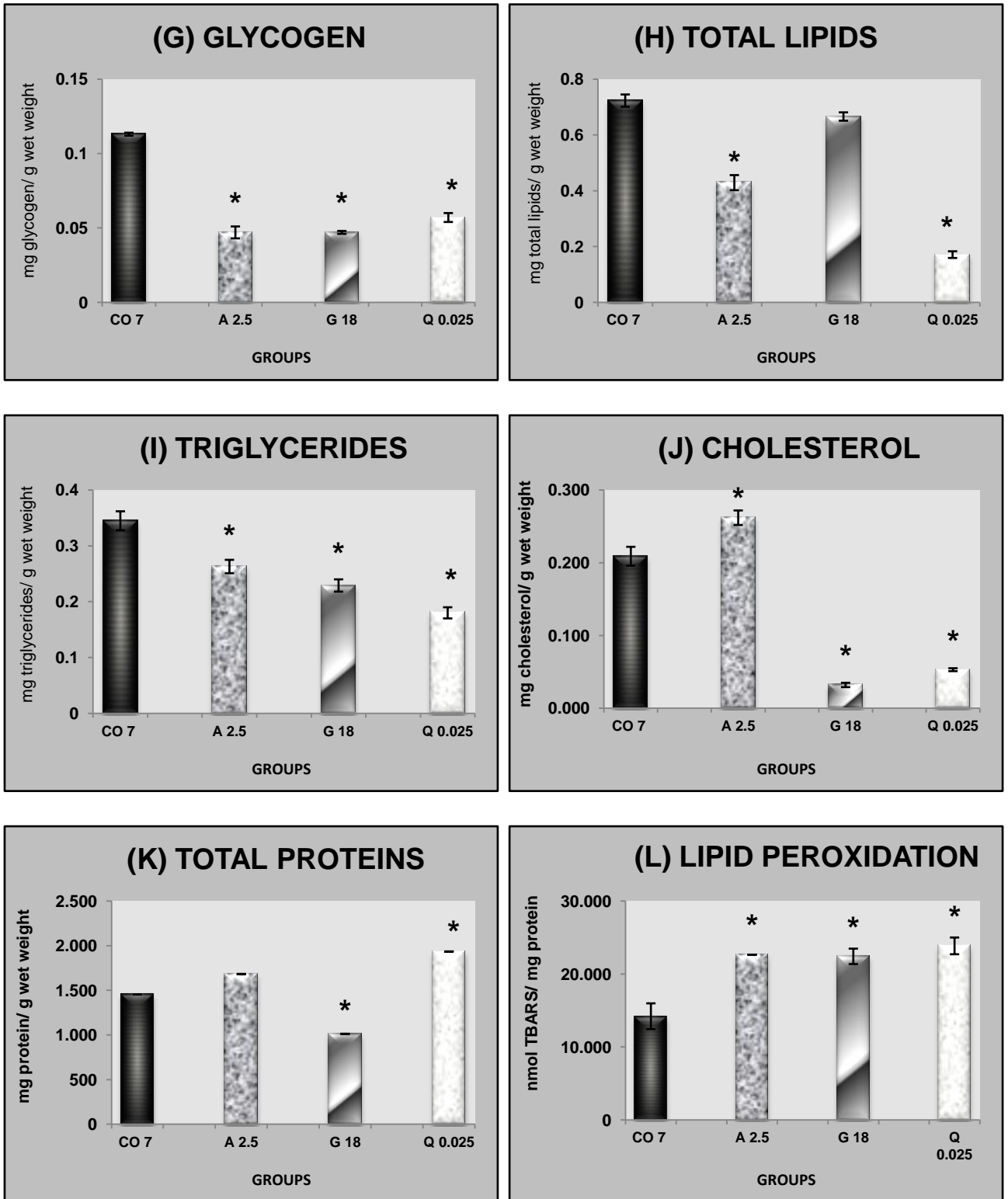


Figure 2: Graphics G, H, I, J, K and L.

MUSCLE

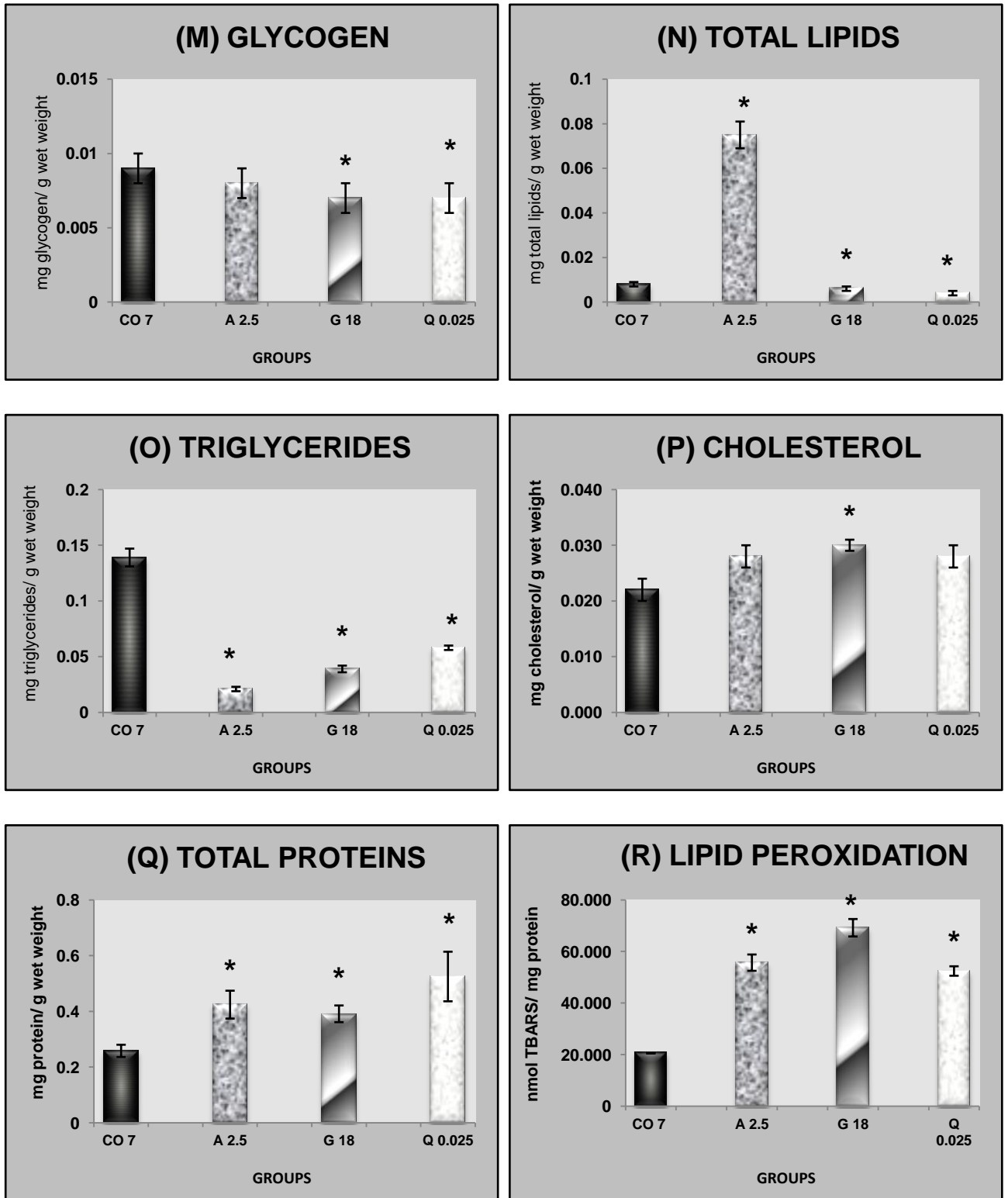


Figure 3: Graphics M, N, O, P, Q and R.

WEIGHT, SIZE AND SURVIVAL

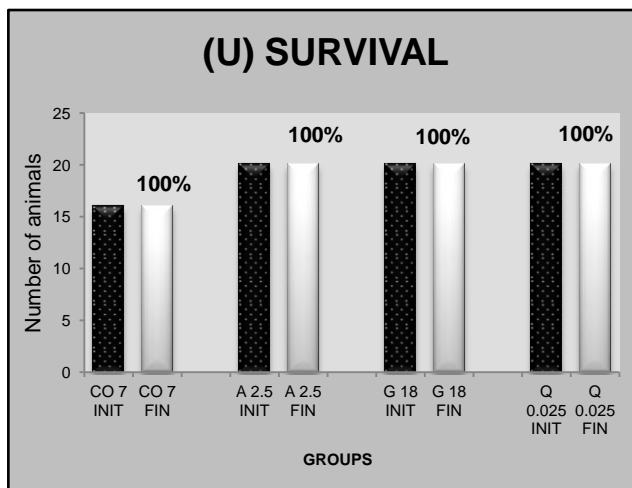
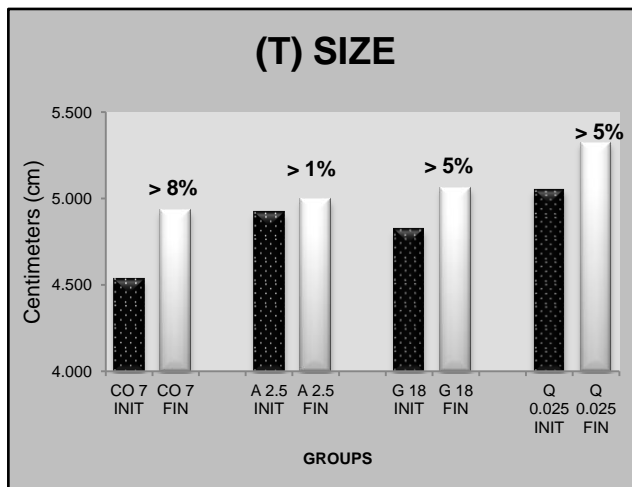
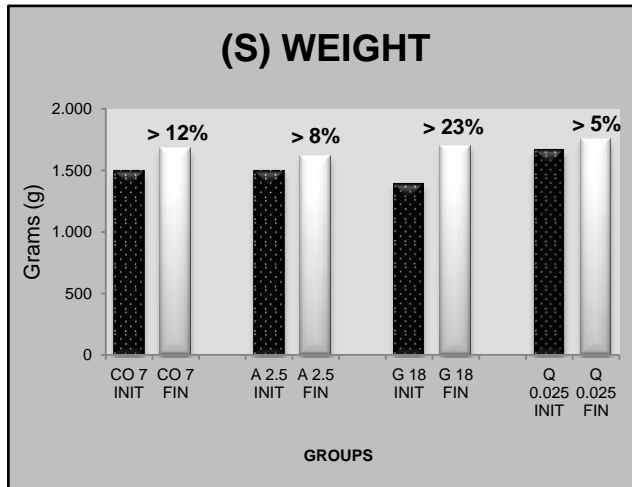


Figure 4: Graphics S, T, and U.

ARTIGO

III

*Implicações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac
sobre a metamorfose e a sobrevivência em girinos de
Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae)”*

**Implicações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac
sobre a metamorfose e a sobrevivência em girinos de
Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae)**

Dornelles, M.F.¹, Oliveira G.T.¹

¹ Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências

Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação

Correspondência para:

Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Faculdade de Biociências

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Laboratório de Fisiologia da Conservação

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250

CP. 1429, Código Postal: 90619-900

Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: 33203545 (4342)

Fax 3320-3612

E-mail: guendato@pucrs.br

Resumo

A metamorfose em girinos se caracteriza por ser uma fase de mudanças severas, e fatores como a exposição a pesticidas podem influenciar negativamente padrões de desenvolvimento nestes animais. O presente trabalho visou avaliar a evolução da fase larval até o desenvolvimento completo da metamorfose em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) expostos a concentrações de 5,0 µg/L, 36 µg/L, e 0,05 µg/L para os herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac, respectivamente. Indivíduos expostos aos herbicidas apresentaram aumento na massa corporal e no comprimento, desenvolveram membros e iniciaram o processo de metamorfose anteriormente ao grupo controle. A metamorfose foi concluída em 50%, 50%, 42% e 23% nos grupos controle, atrazina, glifosato, e quinclorac, respectivamente. Indivíduos expostos a atrazina apresentaram os menores índices de desenvolvimento ao final da metamorfose e o maior índice de gordura animal (IGA), sendo o índice hepatossomático (IHS) superior no grupo exposto ao quinclorac. Indivíduos expostos aos herbicidas apresentaram alterações no fígado, anomalias no corpo e na cauda, e desenvolvimento de infecções secundárias. Com base nestes resultados, podemos supor que a exposição aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac pode influenciar negativamente o padrão de desenvolvimento e a metamorfose em girinos de *L. catesbeianus*, diminuindo suas chances de sobrevivência.

Palavras chave: Agrotóxicos, Anfíbios, Girinos, Pesticidas, Rã-touro

Abstract

The metamorphosis in tadpoles is characterized by a phase of severe changes, and factors such as exposure to pesticides may negatively affect development patterns in these animals. This study aimed to evaluate the evolution of the larval stage until the complete development of metamorphosis in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), exposed to concentrations of 5.0 µg/L, 36 µg/L, and 0.05 µg/L for the herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac. Individuals exposed to herbicides showed an increase in weight and length, developed members, and beginning the process of metamorphosis before the control group. The metamorphosis was completed in 50%, 50%, 42% and 23% for the control group, atrazine, glyphosate and quinclorac, respectively. Individuals exposed to atrazine had the lowest rates of development at the end of metamorphosis and the highest abdominal fat index (AFI), being the hepatosomatic index (HSI) higher in the group exposed to quinclorac. Individuals exposed to herbicides showed alterations in liver, abnormalities in the body and tail, and development of secondary infections. Based on these results, we can presume that exposure to herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac can negatively influence development patterns and metamorphosis in tadpoles of *L. catesbeianus*, decreasing their chances of survival.

Keywords: Agrochemicals, Amphibians, Bullfrog, Pesticides, Tadpoles.

Introdução

Uma série de alterações abruptas na fase pós embriônica, como mudanças estruturais, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais ocorre na transição da fase larval para a fase adulta em anuros. Este processo denominado de metamorfose, determinado não só por fatores genéticos, mas também por fatores ambientais, é considerado como a característica central na história de vida dos anfíbios. (DENVER, 1997; DUELLMAN E TRUEB, 1986; HARRIS, 1999).

Alguns fatores ambientais podem influenciar neste processo, como a exposição a químicos agrícolas, os quais podem acarretar influência negativa no crescimento larval e no desenvolvimento de anfíbios, sendo esta uma causa em potencial do declínio destes animais no mundo todo (ALLRAN, E KARASOV, 2000; JOHANSSON *ET AL.*, 2006; MANN *ET AL.*, 2009).

Respostas fisiológicas em função de fatores como qualidade da água e mudanças bruscas no ambiente físico podem ser responsáveis por fatores de estresse em girinos de *Lithobates catesbeianus*, levando a determinadas alterações como disfunção em padrões de crescimento e desenvolvimento nestes animais (BAMBOZZI *ET AL.*, 2004; ROCHA *ET AL.*, 2010).

Compostos químicos usados amplamente na agricultura de todo o mundo podem estar ligados a fatores passíveis de ocasionar alterações em padrões de desenvolvimento e tempo de metamorfose em girinos. Dentre tais agroquímicos de amplo uso, podemos citar os herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.

A atrazina é descrita como um herbicida seletivo pertencente à família das triazinas, amplamente utilizado no mundo para controle de ervas daninhas, atuando como inibidor da fotossíntese e sendo descrito como danoso a organismos aquáticos (SOLOMON *ET AL.*, 1996). O glifosato se caracteriza como um sal isopropilamínico, não seletivo, altamente fitotóxico, de excelente eficácia no controle de ervas daninhas, considerado como um dos herbicidas menos tóxicos para animais (DUKE E POWLES, 2008). Já o quinclorac é descrito como um ácido quinolínico, seletivo, classificado como mimetizador de auxinas, atuando como inibidor da fotossíntese sendo utilizado no controle do capim-arroz e de angiquinho, contudo, seu modo de ação ainda não é totalmente conhecido (FERREIRA *ET AL.*, 2012).

Tendo em vista que herbicidas amplamente utilizados no mundo podem acarretar uma relação negativa em padrões de desenvolvimento de girinos, o presente trabalho visou observar e descrever padrões de desenvolvimento em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), uma espécie exótica, oriunda no Canadá e introduzida no Brasil na década de 1930, pertencente à família Ranidae, amplamente utilizada em experimentos laboratoriais, principalmente por sua grande plasticidade e ótima capacidade de adaptação (KNOOP *ET AL.*, 2011), desde o período larval até a finalização da metamorfose, após exposição de sete dias aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac.

Para tal, foram realizadas medições biométricas mensais, levando em consideração fatores como massa corporal, comprimento corporal total, tamanho dos membros, além do registro fotográfico do desenvolvimento dos animais e de possíveis anomalias corporais.

Material e métodos

Para a realização do presente trabalho foram adquiridos 50 girinos vivos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae), oriundos do Ranário Ranasul, localizado no município de Imbé/RS – Brasil, pertencentes à mesma desova. Os animais possuíam cerca dois meses e meio de idade, com ausência de membros, na fase G1 de acordo com LIMA E AGOSTINHO (1992) - estando segundo a comparação com a tabela de GOSNER (1960) no estágio 25 de desenvolvimento - e foram transportados em sacos aerados até o Laboratório de Fisiologia da Conservação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Todos os animais foram individualmente pesados, medidos, fotografados e randomicamente distribuídos em aquários de 12 litros com aeração constante, temperatura da água em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH em torno de $6,8\pm 2$, e entre $7,0\pm 2$ após a introdução dos herbicidas nos aquários, e fotoperíodo de 12 horas, subdivididos em grupos: Controle (n=14); Atrazina (n=12); Glifosato (n=12); Quinclorac (n=12). A aclimatação foi de sete dias, no oitavo dia, com exceção do aquário controle, os outros receberam uma concentração de herbicidas de: $5,0\ \mu\text{g/L}$ para o aquário atrazina (Primóleo[®] Syngenta, 400g/L), $36\ \mu\text{g/L}$ para o aquário glifosato (Roundup Original[®] Monsanto, 360g/L), e $0,05\ \mu\text{g/L}$ para o aquário quinclorac (Facet[®] Basf, 500g/Kg). A introdução dos herbicidas na água dos aquários ocorreu apenas uma vez, diluindo-se tanto os herbicidas com formulação líquida (atrazina e glifosato), como o herbicida em formulação em pó (quinlorac) em água destilada na concentração desejada, e acrescido aos aquários. Após sete dias de exposição aos herbicidas, os animais foram completamente removidos para aquários preenchidos somente com água desclorada, com as mesmas condições de temperatura, pH e fotoperíodo iniciais. A cada sete dias o procedimento de limpeza dos aquários foi

efetuada, e os animais foram removidos para aquários limpos, sendo a limpeza dos aquários sujos realizada com um grama de permanganato de potássio diluída em 12 litros de água (tal procedimento minimizou a possibilidade de aparecimento de fungos nos animais, portanto ele foi realizado semanalmente até o final do experimento). Contudo, apesar de tais medidas profiláticas, os animais expostos aos herbicidas não apresentaram resposta positiva ao tratamento quando comparados à eficácia apresentada pelo grupo controle. A alimentação foi realizada com a mesma ração para peixe utilizada no ranário equivalendo a 3% da biomassa de cada aquário até o início do processo de metamorfose, após o aparecimento de membros, a alimentação foi diminuída para 1,5% da biomassa de cada aquário, tendo em vista que em experimentos anteriores os animais diminuíram a ingestão de alimentos durante este período.

Ao final de cada mês os animais foram pesados, medidos e fotografados e a presença de membros foi avaliada. Indivíduos com a presença dos membros posteriores e anteriores, fase G3 de acordo com LIMA E AGOSTINHO (1992), porém ainda com a presença de cauda, foram retirados dos aquários e acomodados em caixas de polietileno devidamente adaptadas. Após a finalização do processo de metamorfose os animais foram pesados e medidos, sendo determinado o coeficiente alométrico dos membros através da seguinte relação matemática: comprimento do membro/comprimento total do animal x 100. Ao final do processo de metamorfose todos os animais foram eutanasiados através do método crioanestésico com posterior transecção da medula espinal dos animais adultos. Em seguida a eutanásia, os fígados de todos os animais foram removidos, fotografados e pesados para avaliação do índice hepatossomático (IHS= massa do fígado/ massa corporal x 100), assim como também foi retirada a gordura abdominal para realização do índice de gordura abdominal (IGA= massa de gordura abdominal/ massa corporal x 100) de cada indivíduo que concluiu a

metamorfose. Os girinos restantes ao final dos nove meses de experimento foram eutanasiados através do método crioanestésico.

Deve-se ressaltar que todos os procedimentos realizados neste trabalho foram previamente autorizados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, cujo número de registro é: CEUA 11/00250, presente na carta de número 157/11- CEUA, de Dezembro de 2011.

Resultados

Massa corporal, comprimento e início do processo de metamorfose – Fase G1-G2

Verifica-se com relação aos girinos em fase G1, ou seja, fase de ausência de membros seguindo as fases de desenvolvimento descritas por LIMA E AGOSTINHO (1992), que o ganho médio de massa corporal até o início do processo de metamorfose foi maior no grupo exposto ao herbicida glifosato, sendo as médias de $\bar{x}=39\%$ para o grupo controle (Fig. 1A), de $\bar{x}=44\%$ no grupo atrazina (Fig. 1B), de $\bar{x}=54\%$ no grupo glifosato (Fig. 1C) e de $\bar{x}=45\%$ no grupo quinclorac (Fig. 1D), porém, todos os animais apresentaram ganho de massa corporal até a fase de início de reabsorção caudal, assim como descrito por HOFFMANN *ET AL.* (1989). Com relação ao comprimento, o grupo exposto ao herbicida glifosato também apresentou uma porcentagem maior de aumento de comprimento total (CT) $\bar{x}=17\%$ e de comprimento de rostro-caudal (C-R-C) $\bar{x}=20\%$ (Fig. 2G) quando comparado aos grupos controle \bar{x} CT=13%, \bar{x} C-R-C= 13% (Fig. 2E), atrazina \bar{x} CT=14%, \bar{x} C-R-C= 16% (Fig. 2F) e quinclorac \bar{x} CT=14%, \bar{x} C-R-C= 15% (Fig. 2H). O grupo de animais expostos ao glifosato também apresentou o início do

processo de metamorfose antes dos outros grupos (Fig. 1C), atingindo a fase de desenvolvimento G2, ou seja, indivíduo em fase larval com presença de membros posteriores, após cerca de 90 dias, enquanto o grupo controle levou cerca de 150 dias (Fig. 1A), e os grupos atrazina e quinclorac em torno de 120 dias (Fig. 1B e 1D).

Desenvolvimento de membros posteriores e anteriores - Fase G2-G3

Os grupos de animais em fase larval G1 expostos aos herbicidas atrazina (Fig. 3J), glifosato (Fig. 3K), e quinclorac (Fig. 3L) desenvolveram membros posteriores anteriormente ao grupo controle (Fig. 3I), sendo que ambos os animais expostos aos herbicidas iniciaram a transição para a fase de desenvolvimento G2 no mês de abril, enquanto o grupo controle iniciou o processo 30 dias após, no mês de maio. O desenvolvimento de membros posteriores para o grupo controle até o final do experimento foi de 11 indivíduos (Fig. 3I), para o grupo atrazina 10 indivíduos (Fig. 3J), 12 indivíduos no grupo glifosato (Fig. 3K), e 09 indivíduos no grupo quinclorac (Fig. 3L). Os animais expostos ao glifosato apresentaram desenvolvimento de membros posteriores para todos os indivíduos do grupo, além ser o grupo com maior número de indivíduos a apresentar tais membros no primeiro mês de desenvolvimento.

O desenvolvimento de membros anteriores, dando início à fase G3 ocorreu nos grupos expostos aos herbicidas atrazina (Fig. 4N) e glifosato (Fig. 4O) no mês de julho. Após 30 (mês de agosto) e 60 dias (mês de setembro), o grupo quinclorac (Fig. 4P) e o grupo controle (Fig. 4M) deram início à fase G3, apresentando o desenvolvimento de membros anteriores, respectivamente. O número de animais que completaram esta fase com desenvolvimento completo dos membros anteriores foi de 07, 06, 05 e 03 indivíduos para os grupos, controle (Fig. 4M), atrazina (Fig. 4N), glifosato (Fig. 4O) e quinclorac (Fig. 4P), respectivamente.

Massa corporal, gordura abdominal, índice hepatossomático (IHS), índice de gordura abdominal (IGA), comprimento e coeficiente alométrico de crescimento dos membros dos indivíduos adultos pós-metamorfose – Fase G3

Com relação à massa corporal média pós metamorfose o grupo de animais expostos ao herbicida quinclorac apresentou o maior ganho de massa corporal entre os indivíduos adultos $\bar{x}=8,480\text{g}$, com relação aos grupos controle $\bar{x}=7,493\text{g}$, atrazina $\bar{x}=6,009\text{g}$ e quinclorac $\bar{x}=7,040\text{g}$ (Fig. 5Q). Já com relação à média de gordura abdominal, os animais expostos ao glifosato $\bar{x}=0,267\text{g}$ apresentaram um valor superior de ganho em comparação com os grupos controle $\bar{x}=0,201\text{g}$, atrazina $\bar{x}=0,255\text{g}$, e quinclorac $\bar{x}=0,233\text{g}$ (Fig. 5Q), o que pode estar ligado a maior ingestão de alimentos e consequentemente maior ganho de massa corporal neste grupo de animais. O índice hepatossomático se mostrou mais elevado nos indivíduos expostos ao quinclorac $\bar{x}=7,5\%$ quando comparados aos grupos controle $\bar{x}=5,5\%$, atrazina $\bar{x}=4,8\%$ e glifosato $\bar{x}=5,6\%$ (Fig. 5R), já o índice de gordura abdominal (IGA) foi maior nos grupos expostos a atrazina $\bar{x}=4,2\%$ e glifosato $\bar{x}=3,8\%$, quando comparados aos grupos controle $\bar{x}=2,7\%$ e quinclorac $\bar{x}=2,7\%$ (Fig. 5S). O comprimento dos indivíduos adultos se destaca entre os grupos controle \bar{x} comprimento total (CT)= $4,120\text{cm}$, \bar{x} comprimento da cabeça (C-CA)= $5,990\text{cm}$, \bar{x} comprimento rostro-caudal (C-R-C)= $1,800\text{cm}$, e grupo exposto ao herbicida quinclorac \bar{x} CT= $4,156\text{cm}$, \bar{x} C-CA= $5,956\text{cm}$, \bar{x} C-R-C= $1,996\text{cm}$, com relação aos grupos expostos aos herbicidas atrazina \bar{x} CT= $3,618\text{cm}$, \bar{x} C-CA= $4,280\text{cm}$, \bar{x} C-R-C= $1,951\text{cm}$, e ao glifosato \bar{x} CT= $3,712\text{cm}$, \bar{x} C-CA= $4,775\text{cm}$, \bar{x} C-R-C= $1,873\text{cm}$ (Fig. 5T). O coeficiente alométrico dos membros também foi superior nos animais dos grupos controle e do grupo exposto ao quinclorac com relação aos membros posteriores, porém não houve grande diferença nos valores entre os grupos com relação ao desenvolvimento dos membros anteriores (Fig. 6U).

Verifica-se que os animais expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac apresentaram alterações visíveis em seus fígados tanto com relação à coloração (em tom marrom), quanto com relação à perda consistência do órgão (Fig. 7).

Massa corporal e comprimento dos indivíduos em fase larval ao final do experimento – Fase G1

Apenas o grupo glifosato apresentou a finalização do processo de metamorfose para todos os indivíduos que sobreviveram até o final do experimento, não havendo nenhum girino em fase G1 para este grupo. No grupo controle restaram 04 girinos em fase G1 com massa corporal média de $\bar{x}=4,120\text{g}$, comprimento \bar{x} CT = $7,690\text{cm}$, \bar{x} C-CA = $2,870\text{cm}$, e \bar{x} C-R-C = $4,817\text{cm}$, no grupo atrazina restaram 02 girinos com massa corporal média de $\bar{x}=3,005\text{g}$, comprimento \bar{x} CT = $6,824\text{cm}$, \bar{x} C-CA = $2,573\text{cm}$, e \bar{x} C-R-C = $4,251\text{cm}$, e no grupo quinclorac restaram 03 girinos com massa corporal média de $\bar{x}=3,000\text{g}$, comprimento \bar{x} CT = $6,826\text{cm}$, \bar{x} C-CA = $2,500\text{cm}$, e \bar{x} C-R-C = $4,368\text{cm}$ (Fig. 6V e 6X, e Tab. 1).

Anomalias e patógenos

Alguns animais apresentaram anomalias corporais como deformidades corporais. Em comparação com indivíduos do grupo controle, um indivíduo exposto ao herbicida glifosato e outro exposto ao herbicida quinclorac apresentaram deformidades na cauda (Fig. 8). Também verificou-se a presença de infecção por fungos e por bactérias (Doença da perna vermelha ou “Red Leg Disease”) em indivíduos expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac, fato que não ocorreu nos indivíduos do grupo controle (Fig. 9 e 10).

Sobrevivência e número de metamorfoses completas ao final do experimento

Ao final do experimento a taxa de sobrevivência no grupo controle foi de 79%, sendo que 07 indivíduos concluíram o processo de metamorfose, para o grupo atrazina a sobrevivência foi de 67% sendo que 06 indivíduos completaram o processo de metamorfose, no grupo glifosato houve 33% de sobrevivência, e 05 girinos concluíram o processo de metamorfose, porém apenas 04 indivíduos sobreviveram, e no grupo quinclorac a taxa de sobrevivência foi de 50%, sendo que apenas 03 indivíduos completaram o processo de metamorfose (Tab. 1). Tal média de sobrevivência do grupo controle está um pouco abaixo do descrito na literatura, não estando, contudo, muito longe dos 86,5% de sobrevivência média para girinos de *Lithobates catesbeianus* em ranários comerciais (KNOOP *ET AL.*, 2011).

Discussão

Fatores bióticos e abióticos podem interagir de diversas formas e influenciar nos padrões de crescimento e desenvolvimento em anfíbios (DENVER, 1997). De acordo com MANN *ET AL.* (2009) e HYNE *ET AL.* (2009) existe uma relação entre o aumento no uso de agroquímicos, como pesticidas, e o declínio no número de anfíbios em todo o mundo.

Observa-se no presente estudo que embora a exposição a pesticidas seja prejudicial aos anfíbios, principalmente na fase larval devido ao contato direto com o ambiente aquático, girinos em fase pré metamorfose expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac apresentaram aumento da massa corporal e no comprimento até o período de início do processo de metamorfose. Talvez isto esteja relacionado ao pouco tempo de exposição aos herbicidas (07 dias), proporcionando ao animal chances de se

reestabelecer frente a possíveis alterações em seu metabolismo por exposição aos tóxicos agrícolas.

Contudo, um fator observado neste trabalho diz respeito ao ganho de massa corporal acentuado nos indivíduos expostos ao herbicida glifosato, fator que provavelmente tenha relação com o aumento no comprimento, início do processo de metamorfose e início de aparecimento de membros, previamente aos indivíduos expostos aos outros herbicidas. DALLEGRAVE *ET AL.* (2003), observaram que ratos expostos ao herbicida glifosato também apresentaram como resposta aumento de massa corporal, além de aumento na ingestão de alimentos, corroborando desta forma, os nossos resultados.

De acordo com CARMONA-OSALDE *ET AL.* (1996) e VOLPATO *ET AL.* (1989) a dieta pode afetar a taxa de desenvolvimento em girinos, os quais só atingirão a metamorfose após ter suas exigências nutricionais cumpridas. Segundo os autores, um grande aumento de massa corporal pode ocorrer em girinos em função do estresse fisiológico gerado por condições ambientais desfavoráveis para a metamorfose. No caso do presente trabalho, estresse fisiológico induzido por alterações nas condições laboratoriais de cultivo em função da exposição aos herbicidas.

Embora um número maior de indivíduos do grupo controle de *L. catesbeianus* tenha desenvolvido membros posteriores (n=11) e anteriores (n=07), os animais expostos a atrazina, glifosato e quinclorac desenvolveram os membros posteriores 30 dias antes dos controles, e os membros posteriores 60 dias antes para os indivíduos dos grupos atrazina e glifosato, e 30 dias antes para os indivíduos do grupo quinclorac em comparação com o grupo controle, indicando uma readaptação do animal frente ao estressor agroquímico e uma possível alteração no tempo de metamorfose nestes animais.

CAUBLE E WAGNER (2005) relatam que girinos expostos ao glifosato apresentaram adiantamento no desenvolvimento de membros em comparação com animais do grupo controle, atingindo a metamorfose mais cedo. Tal processo pode ser explicado devido à capacidade de determinados herbicidas de mimetizar hormônios específicos ou ocasionar alterações no sistema endócrino destes indivíduos. Fatores como estresse em função da exposição ao herbicida também pode ocasionar o adiantamento da metamorfose como uma resposta adaptativa (CAUBLE E WAGNER, 2005).

O tempo médio de desenvolvimento para girinos de *Lithobates catesbeianus* completarem o processo de metamorfose, com temperaturas em torno de 20°C, varia entre 6 a 8 meses, contudo, temperaturas entre 21 e 27°C podem diminuir este tempo para cerca de 3 a 4 meses (VIZZOTO, 1979). A temperatura em que os girinos deste experimento ficaram expostos variou entre 22 e 24°C, portanto o processo de metamorfose deveria oscilar entre 3 a 4 meses segundo VIZOTTO (1979). Girinos expostos ao herbicida glifosato iniciaram seu tempo de metamorfose em 03 meses, girinos expostos a atrazina e quinclorac iniciaram em 04 meses, e girinos controle foram os que levaram mais tempo para iniciar este processo, levando cerca de 05 meses para tal.

HARRIS (1999) cita que o atraso na metamorfose pode ser uma estratégia utilizada pelos girinos para aumentar o tempo de desenvolvimento no período larval, alcançando maiores taxas de crescimento, fator de extrema importância, pois um tamanho maior de indivíduo adulto significa maiores chances de sobrevivência e de sucesso reprodutivo no ambiente terrestre. Porém, estes animais podem lançar mão de algumas estratégias, como minimizar o tempo de desenvolvimento larval e iniciar o

processo de metamorfose em resposta a alterações ambientais, resultando em indivíduos de menor tamanho com menores chances de sobrevivência.

O processo de metamorfose é regulado pelo hormônio da tireoide (TH), o qual se apresenta em níveis baixos durante a fase pré metamorfose, e vai aumentando durante a fase pró metamorfose até atingir seu ponto máximo durante o clímax metamórfico. Alguns compostos agroquímicos podem alterar o tempo de metamorfose em anfíbios, através da inibição da atividade da tireoide, outros, contudo, parecem aumentar a atividade da tireoide, acelerando assim a metamorfose. A indução do hormônio da tireoide também pode ocorrer em como resposta a uma condição de estresse, como a exposição a pesticidas, onde o animal visa acelerar o processo de metamorfose como uma resposta adaptativa (MANN *ET AL.*, 2009). Experimentos futuros podem vir a ser desenvolvidos a fim de elucidar o possível papel da tireoide frente ao estresse provocado por contaminantes químicos, como herbicidas.

Condições de estresse como alterações bruscas nos padrões do ambiente no qual os anfíbios estão inseridos em função da presença de um agente estressor, podem levar a adaptações compensatórias em busca do equilíbrio dinâmico do animal. Tal estresse pode ocasionar diversos tipos de respostas, desde aumento do cortisol, até diminuição de resistência a doenças, deixando o animal mais suscetível a agentes oportunistas como bactérias e fungos (ROCHA *ET AL.*, 2010).

Verificamos no presente trabalho que os herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac atuam como agentes estressores em girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a tais químicos. Como resposta as condições de estresse, os girinos aceleraram seu tempo de metamorfose e apresentaram algumas alterações como deformidades da cauda e no formato do corpo (Fig. 8), além de alterações ocasionadas por fungos (Fig. 9) e bactérias (Fig. 10).

Segundo CUNHA E DELARIVA (2008), *L. catesbeianus* pode atuar como um vetor natural de quitridiomycose, sendo que o fungo pode estar presente nestes anfíbios de forma latente e assintomática. Verifica-se que a exposição aos herbicidas potencializa o desenvolvimento do fungo na epiderme dos anfíbios expostos, diminuindo a imunidade destes animais a tais patógenos, fato que ocorreu em todos os girinos expostos aos herbicidas, porém não nos indivíduos do grupo controle (Fig. 9).

Anuros são animais sensíveis e, portanto, vulneráveis a doenças contagiosas no ambiente aquático. A Doença da Perna Vermelha, ou “Red Leg Disease” se caracteriza por ser uma dermatite bacteriana septicêmica, causada pela bactéria *Aeromonas spp.* e associada ao estresse ou a um ambiente inadequado, a qual pode ser responsável por um grande número de mortalidades neste grupo de animais (RODRIGUEZ SERNA ET AL., 1996).

Nossos resultados corroboram com HYNNE ET AL. (2009) e MANN ET AL. (2009), os quais relatam que o aumento na suscetibilidade de anuros desenvolverem infecções por fungos, especialmente quitridiomycose, está diretamente relacionado à exposição destes indivíduos a pesticidas e a alterações no sistema imune em razão destes contaminantes. Contudo, não podemos afirmar que a doença infecciosa ocasionada por fungos neste estudo seja quitridiomycose, devido à falta de identificação do agente patogênico.

A presença de infecções secundárias nos girinos de *L. catesbeianus* pode ser uma das causas para as alterações nos padrões de desenvolvimento destes animais, como alterações na massa corporal e no tamanho ao final da metamorfose, porém, a presença destes patógenos somente incidiu nos indivíduos expostos aos agroquímicos, não estando presente no grupo controle, demonstrando desta forma, a correlação direta entre o uso de químicos agrícolas com as alterações em girinos em fase larval, e consequentemente no sucesso pós metamorfose.

Após a finalização do processo de metamorfose, verifica-se que os herbicidas podem influenciar negativamente fatores como massa corporal e comprimento dos animais adultos. A exposição aos herbicidas atrazina e glifosato diminuiu em 19 e 6% respectivamente, a massa corporal final, em 12 e 10% respectivamente, o comprimento total, e em 29 e 20% respectivamente, o tamanho dos membros posteriores nos animais destes grupos em comparação com o grupo controle. A massa corporal final no grupo de animais expostos ao herbicida quinclorac, diferentemente dos outros herbicidas, aumentou com relação ao grupo controle, porém o comprimento não apresentou diferença com relação aos indivíduos do controle.

Este aumento de massa corporal em função da exposição ao quinclorac talvez possa ser explicado também pelo fato da maior ingestão de alimento em decorrência de estresse fisiológico como citado por CARMONA-OSALDE *ET AL.* (1996), contudo, diferentemente dos indivíduos expostos ao glifosato, que apresentaram tal comportamento na fase larval, os indivíduos expostos ao quinclorac apresentaram tal respostas somente após a finalização do processo de metamorfose, indicando que mesmo frente a exposição relativamente curtas, os herbicidas podem ser responsáveis por alterações nos padrões de desenvolvimento e no metabolismos dos animais.

A gordura abdominal também se mostrou mais elevada nos animais expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac, assim como o índice de gordura abdominal para os indivíduos dos grupos atrazina e glifosato, quando comparados ao grupo controle, o que pode estar relacionado a um aumento da demanda energética em função do estressor agroquímico, levando o animal a aumentar a ingestão de alimentos e desta forma, armazenar gordura como um estoque energético.

De acordo com WRIGHT *ET AL.* (2011), a gordura corporal em *L. catesbeianus* é um estoque energético, e possui grandes massas ao logo do período larval, tendendo a

umentar no período de pró metamorfose (antes do clímax metamórfico), e diminuir após a metamorfose se completar.

CHOUNG *ET AL.* (2011), e JOHANSSON *ET AL.* (2006) relatam que mesmo concentrações de pesticidas encontradas em ambientes naturais (semelhantes as utilizadas no presente estudo), ou concentrações baixas de atrazina ($> 10 \mu\text{g/L}$), podem acarretar efeitos em padrões de crescimento, desenvolvimento, respostas imunes e comportamentais em girinos, resultando em diminuição no comprimento após a metamorfose, diminuindo desta forma as chances de sobrevivência no animal em ambiente terrestre.

Contudo, em exposição ao pesticida permetrina, JOHANSSON *ET AL.* (2006) encontraram padrões de aumento de tamanho na metamorfose em resposta ao estressor químicos, fato, que segundo os autores, é de difícil explicação sem a realização de experimentos futuros.

O aumento no índice hepatossomático (IHS) em rãs significa que pode estar havendo dano hepático nestes animais, principalmente devido ao aumento na taxa de produção de retículo endoplasmático para a síntese de proteína no tecido hepático (PĂUNESCU E PONEPAL, 2011). Tal fato pode ser observado no índice hepatossomático dos animais expostos aos herbicidas glifosato e quinclorac, os quais apresentaram tais índices acima dos valores observados no grupo controle. Visualmente também pode se observar em comparação com o fígado de um animal do grupo controle, a hepatotoxicidade para estes dois herbicidas, através da mudança brusca na coloração do tecido hepático nestes animais. Avaliações visando à identificação e caracterização das alterações histológicas no tecido hepático devem vir a ser desenvolvidas futuramente, auxiliando desta forma a verificação da intensidade do dano ocasionado pelos herbicidas a tais tecidos.

Conclusão

Com os dados do presente estudo presume-se que a exposição a baixas concentrações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac, mesmo por um período de apenas sete dias, pode acarretar alterações no desenvolvimento após a metamorfose em girinos de *Lithobates catesbeianus*, apesar de durante o desenvolvimento larval os animais apresentarem ganho de massa corporal e aumento no comprimento durante todo o período. Tais alterações visualizadas neste estudo, pode refletir em menores chances de sobrevivência nestes indivíduos durante o processo de metamorfose, além de menor comprimento nos indivíduos expostos aos herbicidas atrazina e quinclorac. Existe a possibilidade de que estes herbicidas também ocasionem prejuízos ao sistema imune, fato reforçado no presente estudo, onde os animais potencializaram a suscetibilidade ao desenvolvimento de fungos e bactérias por exposição a tais agentes químicos, levando a uma maior mortalidade nestes grupos. Pode-se supor que tais fatores tenham influência na capacidade de sucesso na vida adulta, nas chances de sobrevivência e na reprodução destes animais. Contudo, este experimento foi realizado em laboratório, em condições controladas, para girinos de *Lithobates catesbeianus*, não podemos afirmar, portanto, que em ambiente natural, ou para outras espécies, as respostas sejam as mesmas encontradas neste trabalho. Estudos complementares são necessários para ratificar tais resultados.

Apêndices

Figura 1: Gráficos A, B, C e D: Média de massa corporal mensal e porcentagem de ganho com relação ao mês anterior (valor em cima da barra) para indivíduos em fase larval (fase G1) dos grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac até o início da metamorfose;

Figura 2: Gráficos E, F, G e H: Média mensal de comprimento total, comprimento da cabeça (C-CA) e comprimento rostro-caudal (C-R--C) para indivíduos em fase larval (fase G1) dos grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac até o início da metamorfose;

Figura 3: Gráficos I, J, K e L: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros posteriores para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac durante o experimento (fase G2);

Figura 4: Gráficos M, N, O e P: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros anteriores para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac durante o experimento (fase G3);

Figura 5: Gráficos Q: Média de massa corporal, e média de gordura abdominal nos indivíduos após o final do processo de metamorfose para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3); **Gráfico R e S:** Média do índice hepatossomático (IHS), e média do índice de gordura abdominal (IGA) para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3); **Gráfico T:** Média de comprimento total, média de comprimento dos membros posteriores, e média de comprimento dos membros anteriores (nos indivíduos após o final do processo de metamorfose para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3).

Figura 6: Gráfico U: Coeficiente alométrico de crescimento dos membros dos indivíduos ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e

quinclorac; **Gráfico V:** Média de massa corporal dos indivíduos em fase larval ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G1);

Gráfico X: Média de comprimento total, média de comprimento da cabeça (C-CA) e média do comprimento rostro-caudal (C-R-C) dos indivíduos em fase larval ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G1).

Figura 7: Comparação entre os fígados pós metamorfose entre um indivíduo controle um indivíduo exposto ao herbicida atrazina, um indivíduo exposto ao glifosato, e um indivíduo exposto ao quinclorac.

Figura 8: Anomalias visualizadas entre um indivíduo controle, um indivíduo exposto ao herbicida atrazina apresentando deformidade no corpo, um indivíduo exposto ao glifosato apresentando deformidade na cauda e um indivíduo exposto ao quinclorac apresentando deformidade na cauda.

Figura 9: Presença de fungos em indivíduos expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac e comparação com o indivíduo controle.

Figura 10: Presença de infecção bacteriana denominada de “Doença da Perna Vermelha” (Red Leg Disease) em indivíduos expostos aos herbicidas: 1) Indivíduo controle; 2) Indivíduo exposto ao herbicida atrazina; 3) Indivíduo exposto ao glifosato; 4) Indivíduo exposto ao quinclorac.

Tabela 1: Número de indivíduos no início do experimento, número de indivíduos ao final do experimento, número de indivíduos que atingiram a metamorfose e número de girinos sem indícios de presença de membros ao final do tempo total do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Taran Grant, a Equipe do Laboratório de Fisiologia da Conservação, e a CAPES por apoiar esta pesquisa e auxiliar na realização de presente estudo.

Literatura Citada

- Allran, J. W. & W. H. Karasov. 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry, Wisconsin, USA*, 19(11): 2850–2855.
- Bambozzi, A.C.; Seixas Filho, J.T.; Thomaz, L.A.; & L.M.Y. Oshiro. 2004. Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Revista Brasileira de Zootecnia, Rio de Janeiro*, 33(1): 1-7.
- Carmona-Osalde, C.; Olvera-Novoa, M.A.; Rodríguez-Serna, M.; & A. Flores-Nava. 1996. Estimation of protein requirement for bullfrog (*Rana catesbeiana*), tadpoles and its effects on metamorphosis ratio. *Aquaculture Research, USA*, 141:223-231.
- Cauble, K. & R.S. Wagner. 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Portland, USA*, 75:429–435.
- Choung, C.B.; Hyne, R.V.; Mann, R.M.; Stevens, M.M.; & G.C. Hose. 2011. Developmental toxicity of two common corn pesticides to the endangered southern bell frog (*Litoria raniformis*). *Environmental Pollution, Australia*, 159: 2648-2655.
- Cunha, E.R. & R.L. Delariva. 2009. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia, Maringá*, 4(2): 34-46.
- Dallegre, E.; Mantese F.D.; Coelho, R.S.; Pereira, J.D.; Dalsenter, P.R.; & A. Langeloh. 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol. Lett.*, 142: 45–52.
- Denver, R.J., 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *American Zoologist, Michigan*, 37: 172-184.
- Duellman, W.E. & L. Trueb, 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill. 670p.
- Duke, S.O. & S.B. Powles. 2008. Mini-review: Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science, USA*, 64: 319–325.
- Ferreira, E.A.; Concenço, G.; Galon, L.; Delgado, M.N.; Aspiazú, I.; Silva, A.F.; Ferreira, F.A. & R.M.S.A. Meira. 2012. Características micromorfológicas de biótipos de capim - arroz resistente e suscetível ao quinclorac. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, 47(8): 1048-1056.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica, USA*, 16: 183-190.

- Harris, R. N., 1999. The anuran tadpole – Evolution and Maintenance, p. 280-294. In: McDiarmig, R.W., Altig, R. (Ed.). Tadpoles – The biology of anuran larvae. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Hoffmann, D.F.; Leboutte, E.M. & S.M.G. Souza. 1989. Efeito da temperatura e desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). Revista Sociedade Brasileira Zootecnia. Minas Gerais, 18(6): 557-566.
- Hyne, R.V.; Spolyarich, N.; Wilson, S.P.; Patra, R.W.; Byrne, M.; Gordon, G.; Sánchez-Bayo, F. & C.G. Palmer. 2009. Distribution of frogs in rice bays within an irrigated agricultural area: links to pesticide usage and farm practice. Environmental Toxicology and Chemistry, USA, 28(6): 1255–1265.
- Johansson, M.; Piha, H.; Kylin, H. & J. Merilla. 2006. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. Environmental Toxicology and Chemistry, USA, 25(12): 3164-3169.
- Knoop, R.; Ferreira, C.M.; Takahashi, N.S.; França, F.M.; Antonucci, A.M.; Teixeira, P.C.; Sugohara, A.; Dias, D.C.; Tachibana, L. & M. Hipolito. 2011. Influência da incorporação de vitamina C á dieta no desempenho produtivo de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* pós-metamorfoseadas. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, 37(4): 383-391.
- Lima, S. L. & C. A. Agostinho. 1992. A tecnologia de criação de rãs. Editora Imprensa Universitária/UFV, Viçosa, Brasil, 168p.
- Mann, R.M.; Hyne, R.V.; Choung, C.B. & S.P. Wilson. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. Environmental Pollution, USA, 157: 2903–2927.
- Păunescu, A. & C.M. Ponepal. 2011. Effect of Roundup® herbicide on physiological indices in marsh frog *Pelophylax ridibundus*. Scientific Papers, Bucharest, 54: 269-274.
- Rocha, G.C.; Ferreira, C.M.; Teixeira, P.C.; Dias, D.C.; França, F.M.; Antonucci, A.M.; Marcantonio, A.S. & M. Lauretto. 2010. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, 30(10): 891-896.
- Rodriguez-Serna, M.; Flores-Nava, A.; Olvera-Novoa, M. A. & C. Carmona-Osalde. 1996. Growth and production of Bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, at three stocking densities in a vertical intensive culture system. Aquacultural Engineering, USA, 15(4): 233-242.
- Solomon, K.R.; Baker, D.B.; Richards, R.P.; Kenneth, R.D.; Klaine, S.J.; Lapoint, T.W.; Kendall, R.J.; Weisskopf, C.P.; Giddings, J.M.; Giesy, J.P.; Hall Jr, L.W. & W.M. Williams. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North american surface waters. Environmental Toxicology and Chemistry, USA, 15(1): 31-76.
- Vizotto, L.D. 1979. Aspectos técnicos da ranicultura. In: Encontro Nacional De Ranicultura, 1, Brasília, DF. Anais... Brasília: Ministério da Agricultura, 28-69.
- Volpato, G.L.; Frioli, P.M.A. & M.P. Carrieri. 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a general view about the causal mechanisms. Boletim de Fisiologia Animal, São Paulo, 13: 07-22.
- Wright, M.L.; Richardson, S.E. & Bigos J.M. 2011. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: Changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. Comparative Biochemistry and Physiology, USA, 160: 498–503.

MÉDIA DE MASSA CORPORAL MENSAL DE INDIVÍDUOS EM FASE LARVAL (FASE G1) ANTERIOR AO INÍCIO DO PROCESSO DE METAMORFOSE

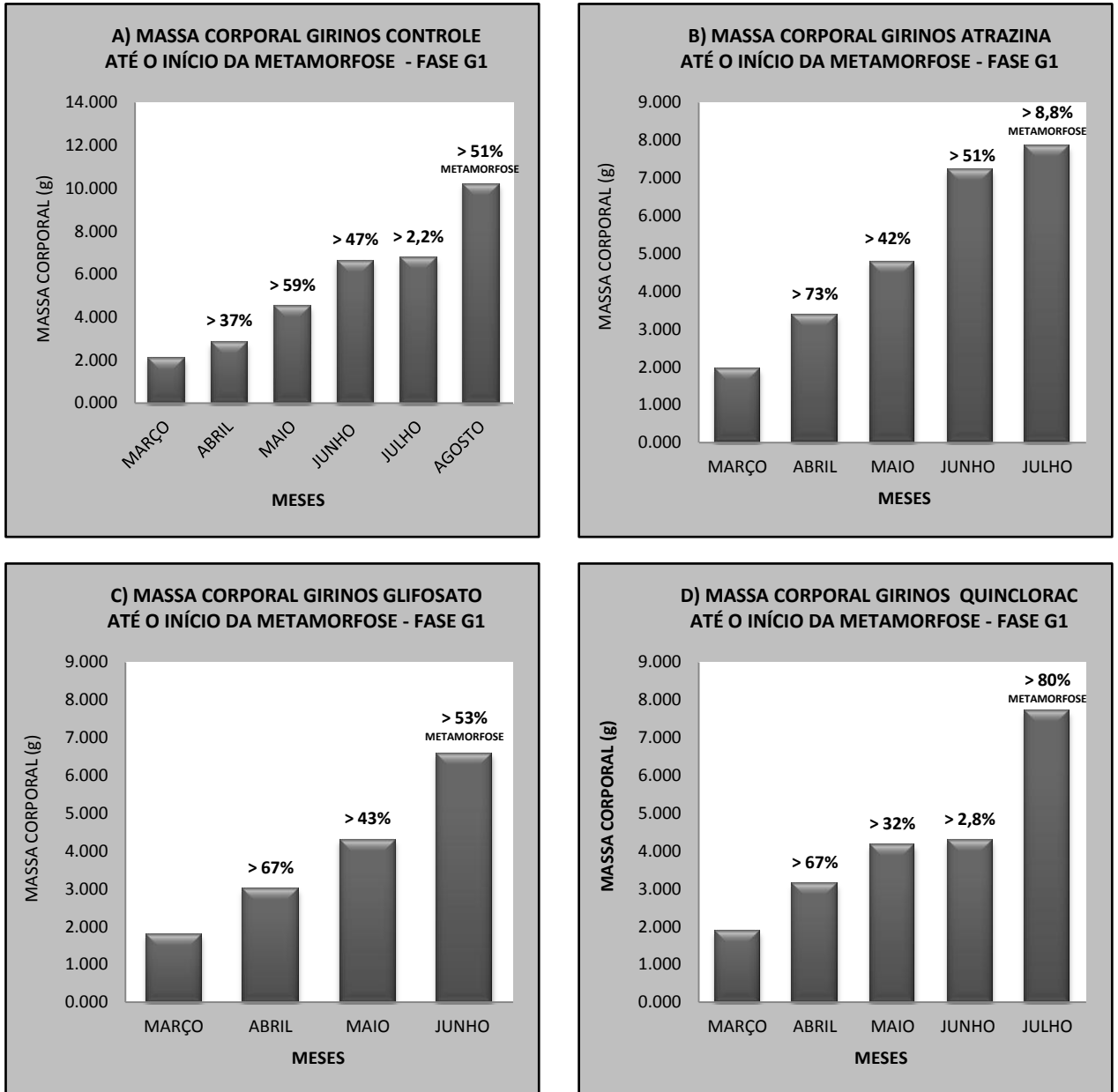


FIGURA 1:

- Gráfico A:** Média de massa corporal mensal e porcentagem de ganho com relação ao mês anterior (valor em cima da barra) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo controle até o início da metamorfose;
- Gráfico B:** Média de massa corporal mensal e porcentagem de ganho com relação ao mês anterior (valor em cima da barra) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo atrazina até o início da metamorfose;
- Gráfico C:** Média de massa corporal mensal e porcentagem de ganho com relação ao mês anterior (valor em cima da barra) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo glifosato até o início da metamorfose;
- Gráfico D:** Média de massa corporal mensal e porcentagem de ganho com relação ao mês anterior (valor em cima da barra) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo quinclorac até o início da metamorfose.

MÉDIA DE COMPRIMENTO MENSAL DE INDIVÍDUOS EM FASE LARVAL (FASE G1) ANTERIOR AO INÍCIO DO PROCESSO DE METAMORFOSE

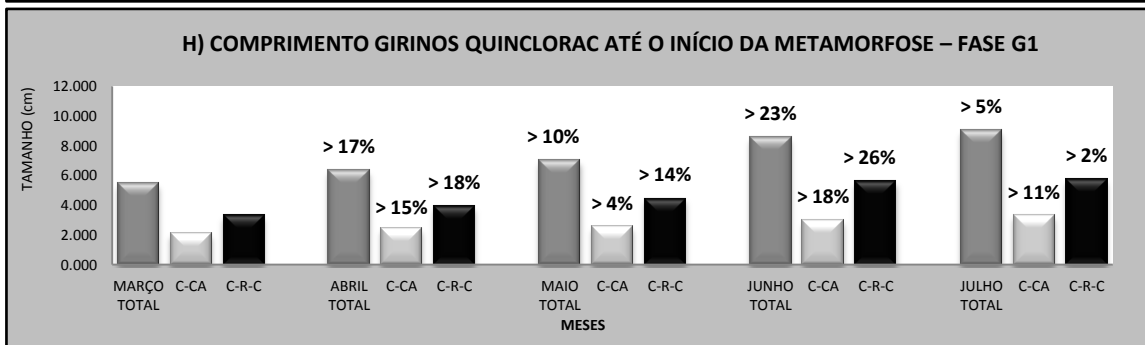
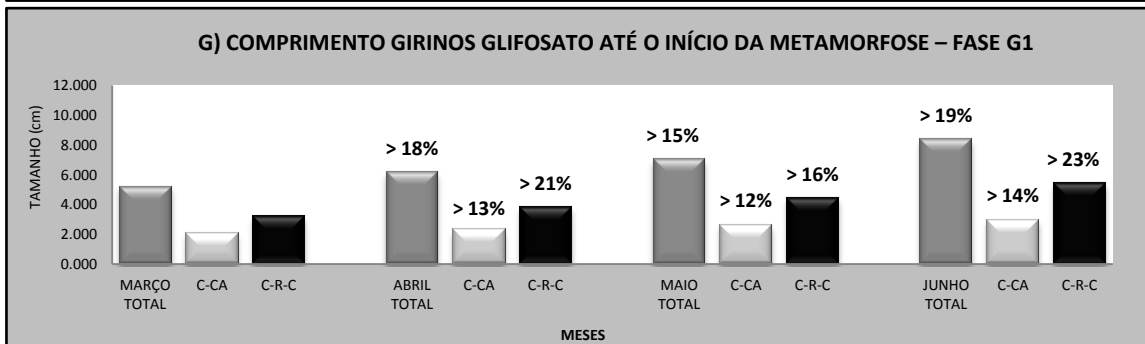
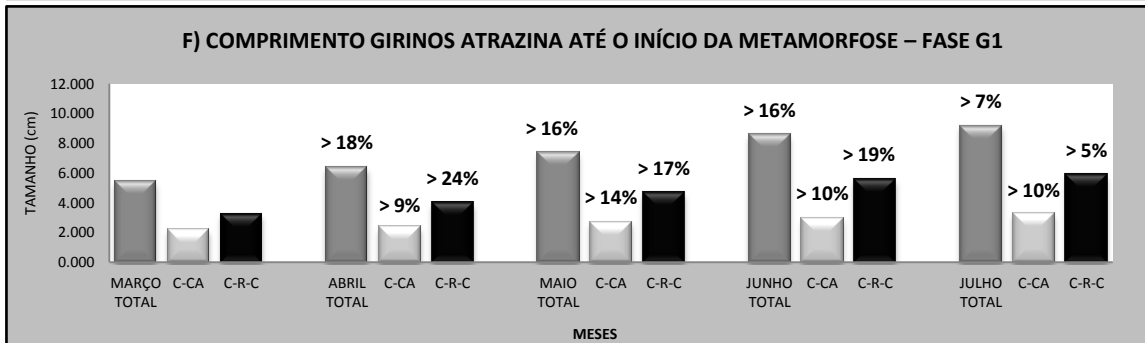
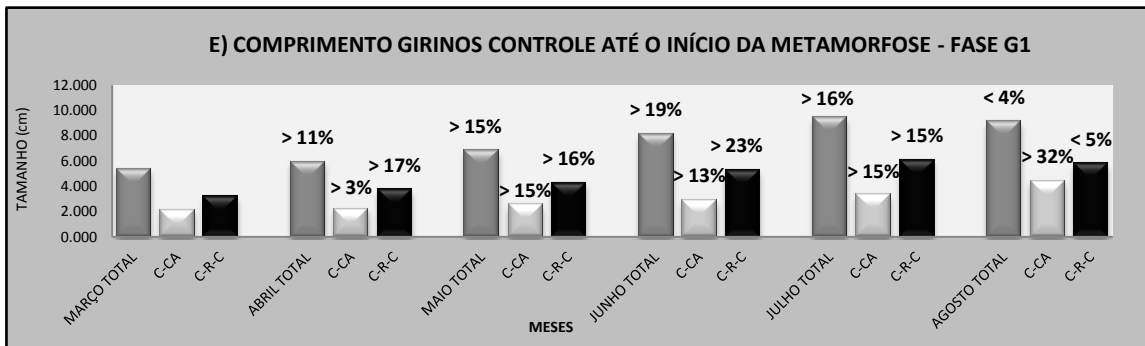


FIGURA 2: Gráfico E: Média mensal de comprimento total, comprimento da cabeça (C-CA) e comprimento rostro-caudal (C-R--C) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo controle até o início da metamorfose;

Gráfico F: Média mensal de comprimento total, comprimento da cabeça (C-CA) e comprimento rostro-caudal (C-R--C) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo atrazina até o início da metamorfose;

Gráfico G: Média mensal de comprimento total, comprimento da cabeça (C-CA) e comprimento rostro-caudal (C-R--C) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo glifosato até o início da metamorfose;

Gráfico H: Média mensal de comprimento total, comprimento da cabeça (C-CA) e comprimento rostro-caudal (C-R--C) para indivíduos em fase larval (fase G1) do grupo quinclorac até o início da metamorfose.

*O valor expresso acima da barra das médias indica a porcentagem de aumento de tamanho entre os meses.

NÚMERO MENSAL DE INDIVÍDUOS EM FASE LARVAL (FASE G2) QUE DESENVOLVERAM MEMBROS POSTERIORES DURANTE O EXPERIMENTO

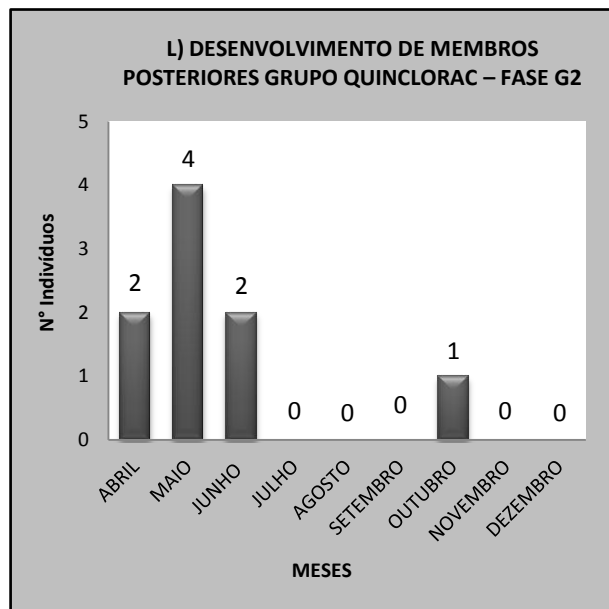
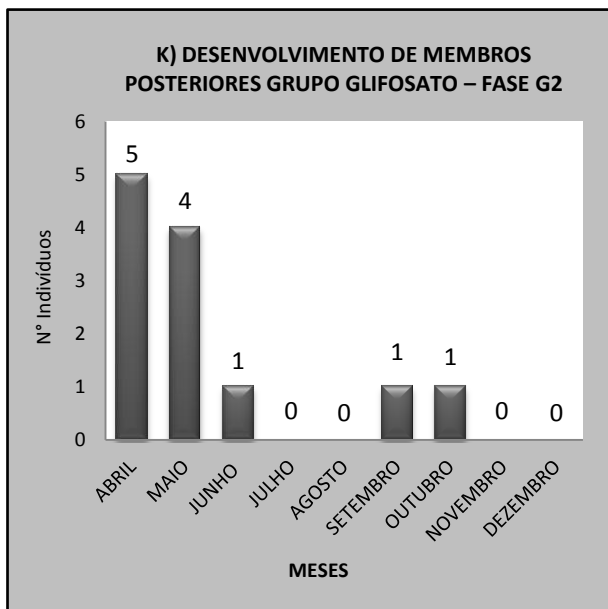
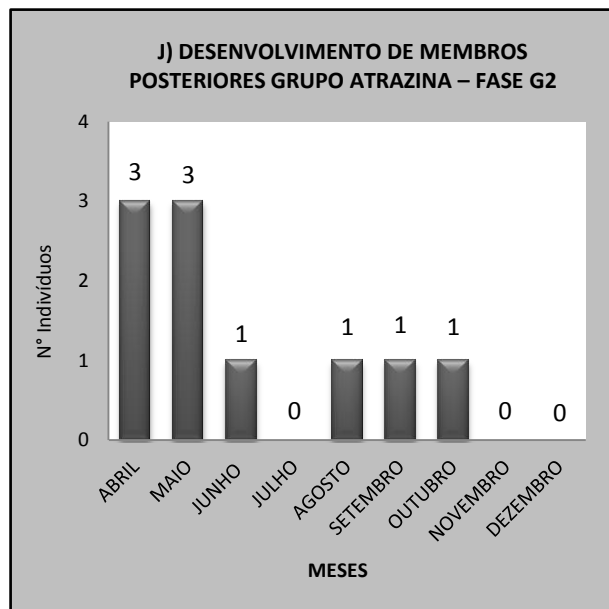
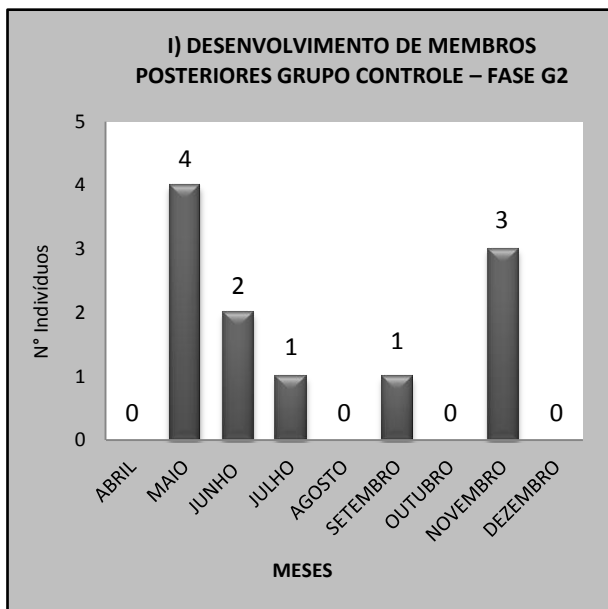


FIGURA 3: Gráfico I: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros posteriores para o grupo controle durante o experimento (fase G2);

Gráfico J: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros posteriores para o grupo atrazina durante o experimento (fase G2);

Gráfico K: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros posteriores para o grupo glifosato durante o experimento (fase G2);

Gráfico L: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros posteriores para o grupo quinclorac durante o experimento (fase G2).

NÚMERO MENSAL DE INDIVÍDUOS EM FASE LARVAL (FASE G3) QUE DESENVOLVERAM MEMBROS ANTERIORES DURANTE O EXPERIMENTO

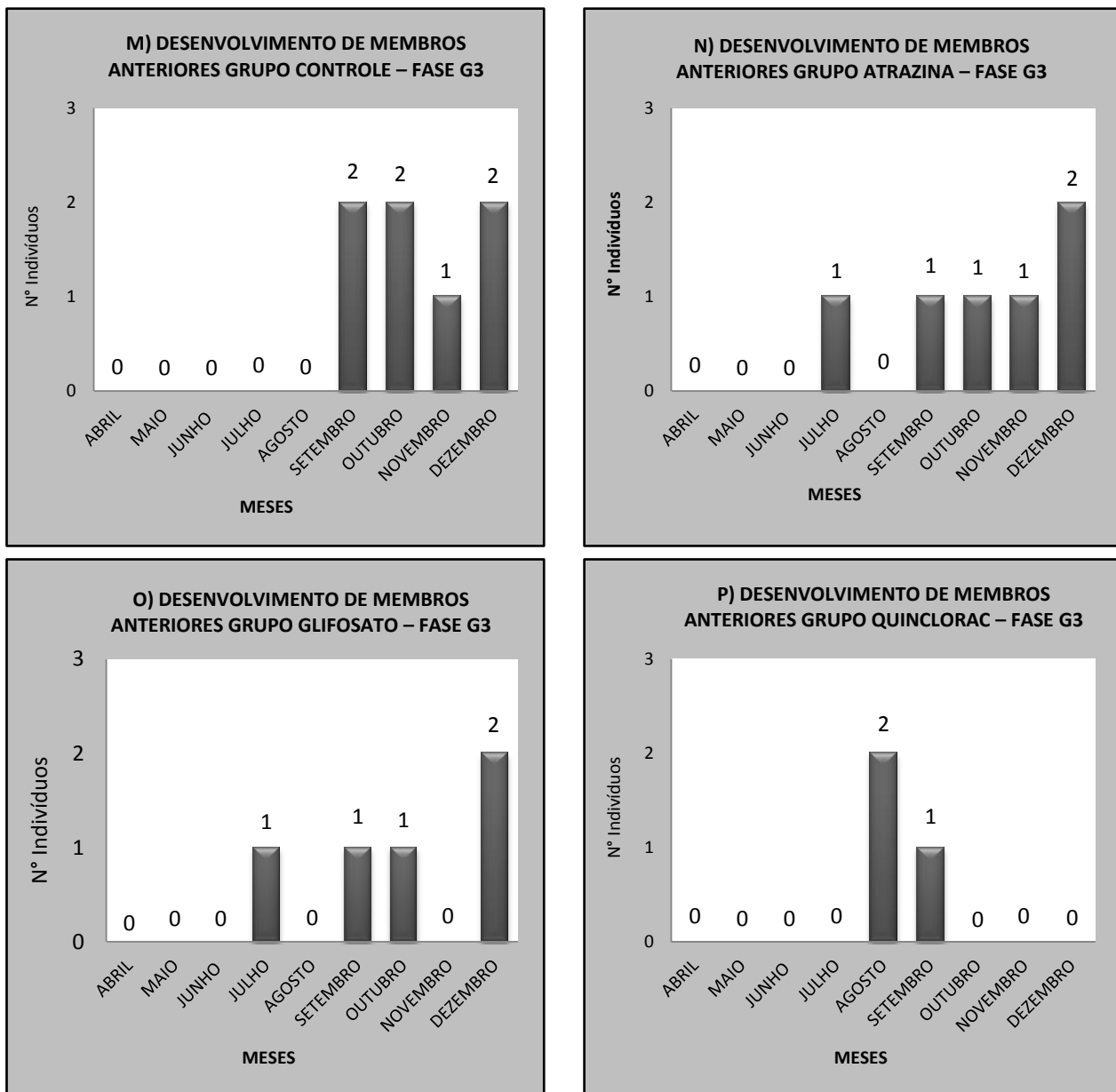


FIGURA 4: Gráfico M: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros anteriores para o grupo controle durante o experimento (fase G3);

Gráfico N: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros anteriores para o grupo atrazina durante o experimento (fase G3);

Gráfico O: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros anteriores para o grupo glifosato durante o experimento (fase G3);

Gráfico P: Número mensal de indivíduos em fase larval que desenvolveram membros anteriores para o grupo quinclorac durante o experimento (fase G3).

MASSA CORPORAL MÉDIA, GORDURA ABDOMINAL, COMPRIMENTO E ÍNDICE HEPÁTOSOMÁTICO DOS INDIVÍDUOS APÓS A FINALIZAÇÃO DO PROCESSO DE METAMORFOSE - FASE G3

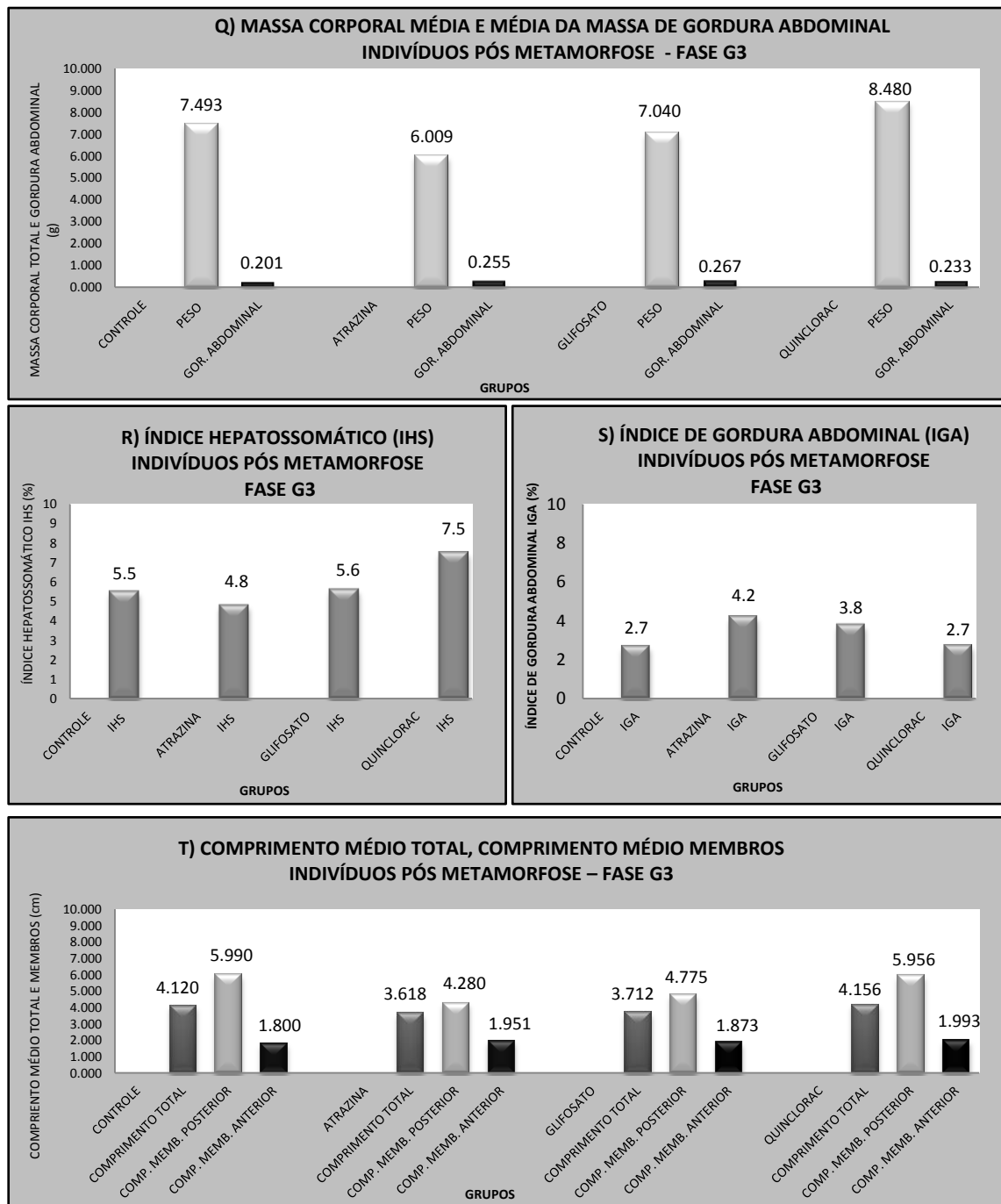


Figura 5: Gráfico Q: Média de massa corporal, e média de massa de gordura abdominal (gor. abdominal) nos indivíduos após o final do processo de metamorfose para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3);

Gráfico R e S: Média do índice hepatossomático (IHS) e média do índice de gordura abdominal (IGA) para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3);

Gráfico T: Média de comprimento total, média de comprimento dos membros posteriores (comp. memb. posterior), e média de comprimento dos membros anteriores (comp. memb. anterior) nos indivíduos após o final do processo de metamorfose para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G3).

COEFICIENTE ALOMÉTRICO DOS MEMBROS, MÉDIA DE MASSA CORPORAL, MÉDIA DE COMPRIMENTO TOTAL, MÉDIA DE COMPRIMENTO DA CABEÇA (C-CA) E MÉDIA DO COMPRIMENTO ROSTRO-CAUDAL (C-R-C) INDIVÍDUOS FASE G1 AO FINAL DO EXPERIMENTO

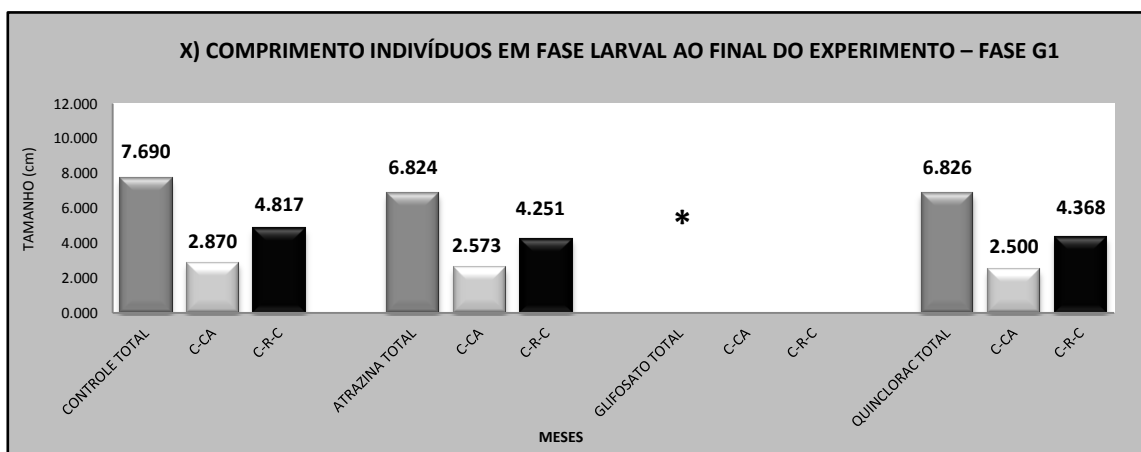
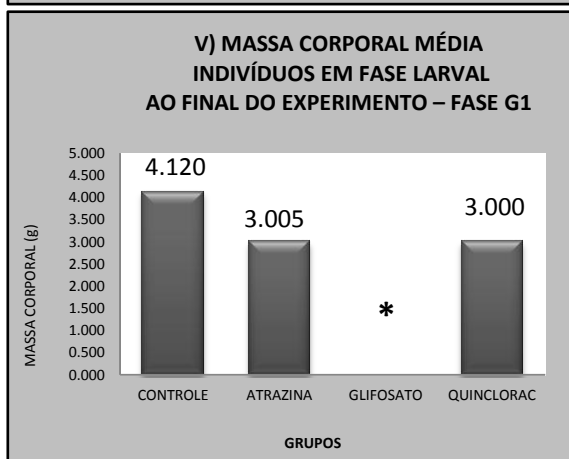
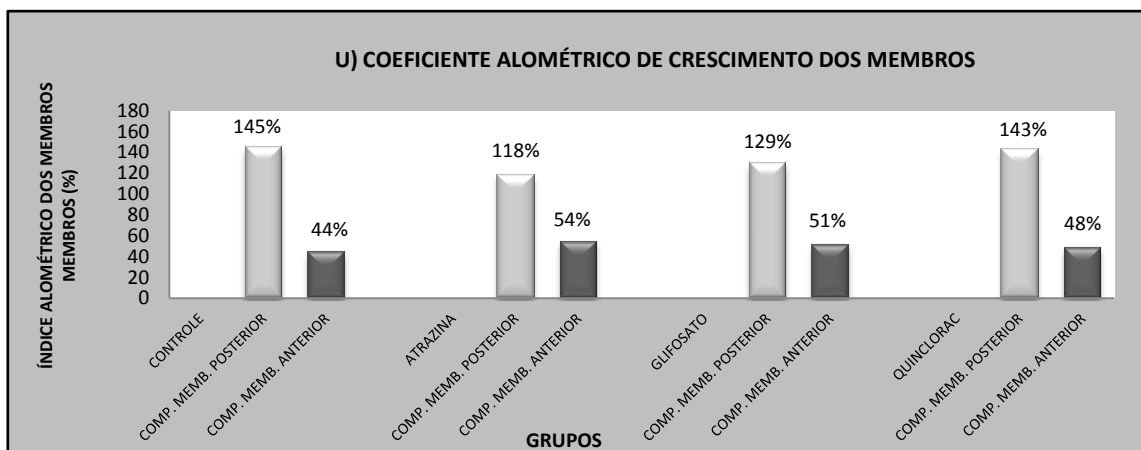


Figura 6: Gráfico U : Coeficiente alométrico de crescimento dos membros dos indivíduos ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac;

Gráfico V : Média de massa corporal dos indivíduos em fase larval ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase g1).

O asterisco indica que ao final do experimento não havia nenhum indivíduo do grupo glifosato nesta fase.;

Gráfico X: Média de comprimento total, média de comprimento da cabeça (C-CA) e média do comprimento rostro-caudal (C-R-C) dos indivíduos em fase larval ao final do experimento para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac (fase G1).

O asterisco indica que ao final do experimento não havia nenhum indivíduo do grupo glifosato nesta fase.

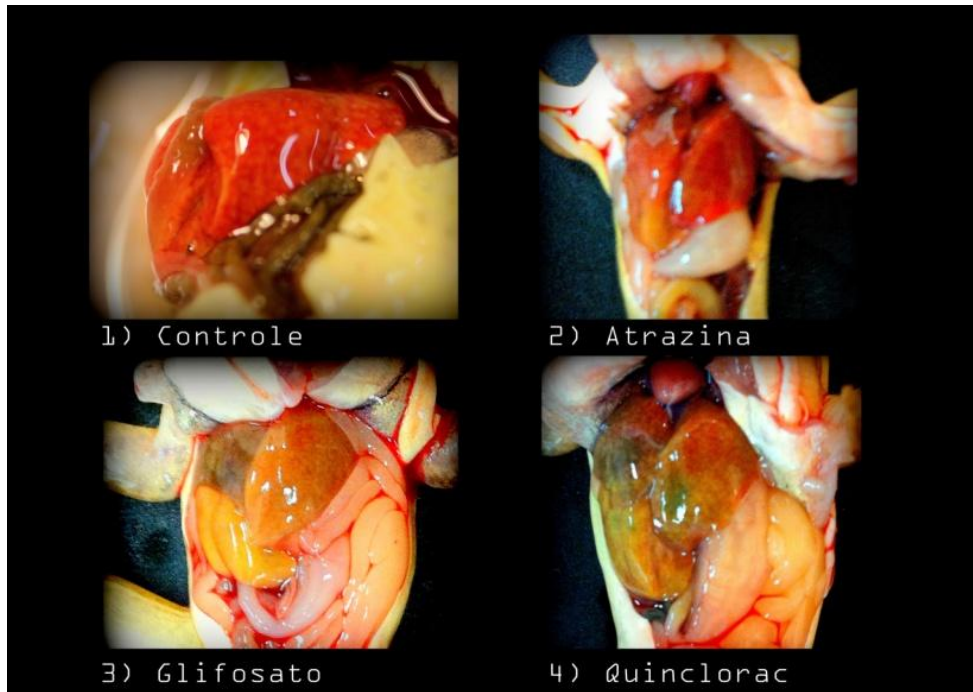


Figura 7: Comparação entre os fígados pós metamorfose de um indivíduo controle (1), um indivíduo exposto ao herbicida atrazina (2), um indivíduo exposto ao glifosato (3), e um indivíduo exposto ao quinclorac (4).



Figura 8: Anomalias visualizadas entre os indivíduos expostos aos herbicidas: 1) Indivíduo controle sem presença de anomalias; 2) Indivíduo exposto ao herbicida atrazina apresentando deformidade no corpo, 3) Indivíduo exposto ao glifosato apresentando deformidade na cauda.

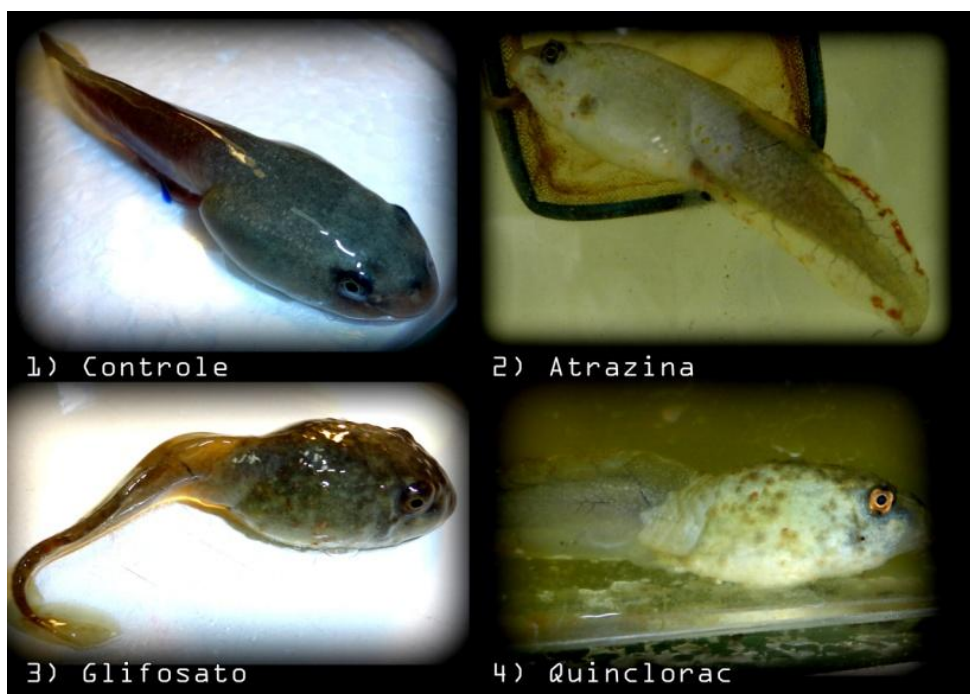


Figura 9: Presença de fungos em indivíduos expostos aos herbicidas: 1) Indivíduo controle; 2) Indivíduo exposto ao herbicida atrazina; 3) Indivíduo exposto ao glifosato; 4) Indivíduo exposto ao quinclorac.

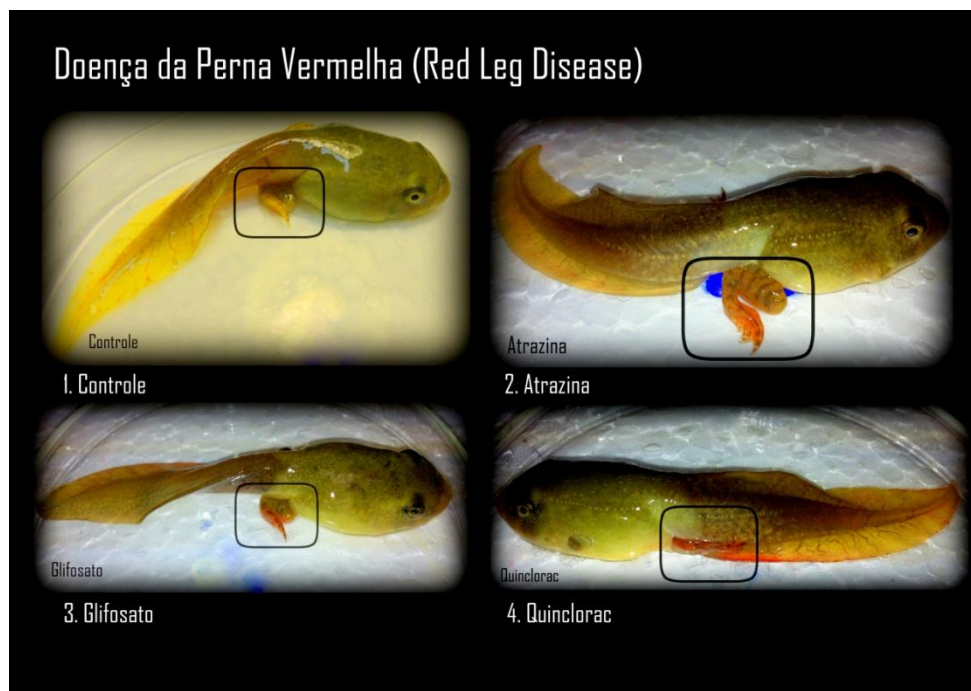


Figura 10: Presença de infecção bacteriana denominada de Doença da Perna Vermelha (Red Leg Disease) em indivíduos expostos aos herbicidas: 1) Indivíduo controle; 2) Indivíduo exposto ao herbicida atrazina; 3) Indivíduo exposto ao glifosato; 4) Indivíduo exposto ao quinclorac.

TABELAS

Tabela 1: Número de indivíduos no início do experimento, número de indivíduos ao final do experimento, número de indivíduos que finalizaram o processo de metamorfose e número de indivíduos que não iniciaram o processo de metamorfose até o final do experimento (girinos sem indícios de presença de membros ao final do tempo total do experimento) para os grupos controle, atrazina, glifosato e quinclorac.

1) GRUPOS	CONTROLE	ATRAZINA	GLIFOSATO	QUINCLORAC
N° indivíduos no início do experimento	14	12	12	12
N° indivíduos ao final do experimento	11	08	04	06
N° de metamorfoses completas ao final do experimento	07	06	05	03
N° de girinos ao final do experimento	04	02	00	03

CONCLUSÕES GERAIS

Com o presente trabalho conclui-se que concentrações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac comumente encontradas em corpos d'água naturais e concentrações destes herbicidas abaixo das permitidas pela legislação, podem ocasionar alterações nos parâmetros bioquímicos como nos níveis de glicogênio, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol e proteínas totais, além de induzir a peroxidação lipídica em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802); apesar de não termos observado uma mortalidade significativa, nem tampouco alterações no ganho de massa corporal ou comprimento corpóreo destes animais.

Tais alterações na composição bioquímica em girinos de *Lithobates catesbeianus* podem refletir em um maior gasto energético para a manutenção da homeostase frente ao estressor agroquímico e talvez este desequilíbrio, possa alterar outros parâmetros biológicos, como: diminuição no sucesso reprodutivo; alterações nos padrões de desenvolvimento e na metamorfose destes indivíduos.

Durante a fase larval de *Lithobates catesbeianus* os girinos não apresentaram alterações no desenvolvimento, porém, verifica-se que a exposição aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac pode diminuir as chances de sobrevivência destes animais durante o processo de metamorfose, ocasionando diminuição no comprimento destes indivíduos na fase de pós metamorfose, além de acarretar, possivelmente, alterações no sistema imune, potencializando a suscetibilidade no desenvolvimento de fungos e bactérias, fato que pode refletir em prejuízos na sobrevivência e vida adulta destes animais.

Podemos sugerir que o aumento no uso de agrotóxicos pode ser um fator importante para o declínio da abundância e diversidade de anfíbios no mundo todo, contudo, cabe ressaltar que tais pesquisas foram realizadas apenas com girinos de *Lithobates catesbeianus*, em laboratório e sob condições controladas. Não podemos, portanto, afirmar que outras espécies, ou em ambiente natural, as respostas sejam semelhantes às encontradas neste estudo.

Contudo, mais estudos são necessários para afirmar que outras espécies de anfíbios possam apresentar as mesmas respostas.

REFERÊNCIAS

- Adamu, K.M., Kori-Siakpere, O., 2011. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana Tobaccum*) leaf dust on some biochemical parameters of hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54, 183-196.
- Aldana-Madrid, M.L., Shibayama, N., Calderon, M., Silva, A., Silveira-Gramont, M.I., Tsutsumi, V., Zuno-Floriani, F.G., Rincón-Sánchez, A.R., 2012. Hepatic effects from subacute exposure to insecticides in adult male wistar rats. In: Perven, F. (ed.) *Insecticides – advances in integrated pest management*, Intech: Rijeka, Croatia, 279-290.
- Alkahlen, H.F., 1996. Effects of lethal and sublethal concentrations of lindane on the behavior and energy reserves of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. *J. King. Saud. Univ.* 8:2, 153-164.
- Allran, J.W., Karasov, W.H., 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:11, 2850–2855.
- Al-Othman, A.M., Khaled, S.A., Gaber, E.E., Kareem, Y., Zeid, A.A., Mourad, A.M., John, P.G., 2011. Protection of α -tocopherol and selenium against acute effects of malathion on liver and kidney of rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 5:10, 1263-1271.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 72, 199-205.
- Bambozzi, A.C., Seixas Filho, J.T., Thomaz, L.A., Oshiro, L.M.Y., 2004. Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *R. Bras. Zootec.*, 33:1, 1-7.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova.* 113-123.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 10, 3-26.
- Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silvercatfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72, 1734–1739.
- Belluck, D.A., Benjamin, S.L., Dawson, T., 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: Risk assessment, policy, and legal implications IN: *Pesticide transformation products: Fate and significance in the environment*. ACS Symposium Series 459. American Chemical Society, Washington, DC. 254-273.
- Berti, A.P., Düsman, E., Soares, L.C., Grassi, L.E.A., 2009. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, 4:1, 45-51.
- Blaustain, A.R.; Wake D.B., 1995. The Puzzle Of Declining Amphibian Population. *Scientific American*, 272: 56 – 61.
- Blaustein, A.R., Johnson, P.T.J., 2003. The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.*, 1:2, 87–94.
- Blaustain, A.R., Bancroft, B.A., 2007. Amphibian population declines: evolutionary considerations. *BioScience*, 57:5, 437-445.

- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91, 179-194.
- Briges, C.M., Semlitsch, R.D., 2000. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology*. 14:5, 1490- 1499.
- Brocardo, P. S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., Rodrigues, A.L.S., Dafre, A.L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology*, 207, 283-291.
- Boone, M.D., Cowman, D., Davidson, C., Hayes, T., Hopkins, W., Relyea, R., Schiesari, L., Semlitsch, R., 2005. Evaluating the role of environmental contamination in amphibian population declines. In: Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., McKay, J. E., Mendelson III, J. R. Ed., 2005. *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland, 32-35.
- Both, C., 2009. Riqueza, composição de guildas e padrões de co-ocorrência de comunidades de girinos em poças no sul do Brasil. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. 85p.
- Brasil, Ministério da Saúde, 2004. Portaria n.º 518, de 25/3/2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.
- Brasil, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução n.º 357, de 17/3/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipids peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 52,302-310.
- Bueno-Guimarães, H.M., Ferreira, C.M., Garcia, M.L.B., Saldiva, P.H.N., 2001. Tadpole epithelium test: potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67, 202–209.
- Carmona-Osalde, C., Olvera-Novoa, M.A., Rodríguez-Serna, M., Flores-Nava, A., 1996. Estimation of protein requirement for bullfrog (*Rana catesbeiana*), tadpoles and its effects on metamorphosis ratio. *Aquaculture*, 141, 223-231.
- Cattaneo, R., 2009. Parâmetros metabólicos e histológicos de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos à formulação comercial do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Naturais e Exatas, 45 p.
- Cauble, K., Wagner R.S., 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull. of Environ. Contam. Toxicol.*, 75, 429–435.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 2006. Metabolismo dos lipídeos complexos e colesterol e metabolismo dos esteróides. IN: Champe, P.C., Harvey, R.A. *Bioquímica Ilustrada*. 2ª ED. Porto Alegre: Artes Médicas, 199-242.
- Chang, C.C., Lee, P.P., Hsu, J.P., Yeh, S.P., Cheng, W., 2006. Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short term trichlorfon exposure. *Aquaculture*, 253, 653–666.
- Choung, C.B., Hyne, R.V., Mann, R.M., Stevens, M.M., Hose, G.C., 2011. Developmental toxicity of two common corn pesticides to the endangered southern bell frog (*Litoria raniformis*). *Env. Pollution*, 159, 2648-2655.

- Coelho, E.R.C., Bernardo, L.D., Almeida, H., Landgraf, M.D.; Tangerino, E.P., 2001. Avaliação da filtração lenta na remoção de matéria orgânica natural, microrganismos e atrazina. In: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental; AIDIS. Saneamento ambiental: desafio para o século 21. Rio de Janeiro, ABES: 1-12.
- Costa, M.J., Monteiro, D.A., Oliveira-Neto, A.L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup original. *Ecotoxicol.*, 17, 153–163.
- Cunha, E.R., Delariva, R.L., 2009. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, 4:2, 34-46.
- Dallegrave, E., Mantese F.D., Coelho, R.S., Pereira, J.D., Dalsenter, P.R., Langeloh, A. 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol. Lett.*, 142: 45–52.
- Denver, R.J., 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Amer. Zool.*, 37: 172-184.
- Dörfler, U., Feicht, E.A., Scheunert, I., 1997. S-triazine residues in groundwater. *Chemosphere*, 35:99-106.
- Dua, R., Kumar, V., Sunkaria, A., Gill, K.D., 2010. Altered glucose homeostasis in response to aluminium phosphide induced cellular oxygen deficit in rat. *Indian J. Exp. Biol.*, 722-730.
- Duellman, W.E. Trueb, L., 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill. 670p.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Mini-review: Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.*, 64, 319–325.
- El-Banna, S.G., Attia, A.M., Hafez, A.A., El-Kazaz, S.A., 2009. Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/ antioxidant parameters in rat males exposed to chlorpyrifos. *Slovak. J. Anim. Sci.*, 42, 111-117.
- Ezemonye, L., Ilechie, I., 2007. Acute and chronic effects of organophosphate pesticides (basudin) to amphibian tadpoles (*Ptychadena bibroni*). *Afr. J. Biotech.* 6:11, 1554 – 1568.
- Ezemonye, L., Tongo, I., 2009. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2:1, 29-36.
- Farombi, E.O., Ajimoko, Y.R., Adelowo, O.A., 2008. Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water african catfish, (*Clarias gariepinus*). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 5:5, 423-427.
- Ferreira, E.A., Concenço, G., Galon, L., Delgado, M.N., Aspiazú, I., Silva, A.F., Ferreira, F.A. Meira, R.M.S.A., 2012. Características micromorfológicas de biótipos de capim-arroz resistente e suscetível ao quinclorac. *Pesq. Agropec. Bras.*, 47:8, 1048-1056.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.A., 1957. Simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Frings, C.E., Dunn, R.A., 1970. Colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *Am. Jour. of Clin. Pathol.*, 53, 89-91.
- Gajanayake, R., 2005. Evaluation of the new active quinclorac in the produc drive herbicide. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Canberra, Australia. 32p.
- Galon L., Concenço, G., Ferreira, E.A., Silva, A.F., Ferreira, F.A., Noldin, J.A., Freitas, M.A.M., 2009. Competição entre plantas de arroz e biótipos de capim-arroz (*Echinochloa spp.*) resistente e suscetível ao quinclorac. *Planta Daninha*, 27, 701-709.

- Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R.D., Church, D.R., McKay, J.E., Mendelson III, J.R. Ed., 2005. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland, 68p.
- Gijare, S.S., Raja, I.A., Tanatarpale, V.T., Kulkarni, K.M., 2011. Lipid changes in the freshwater fish *Ophiocephalus punctatus* exposed to synthetic pyrethroid cypermethrin. Biosci. Biotech. Res. Comm., 4:1, 52-54.
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 16: 183-190.
- Gultekin, F., Ozturk, M., Akdogan, M., 2000. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). Arch. Toxicol., 74, 533–538.
- Gurushankara, H.P., Meenakumari, D., Krishnamurthy, S.V., Vasudev, V., 2007. Impact of malathion stress on lipid metabolism in *Limnonectes limnocharis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 88, 50–56.
- Harris, R.N., 1999. The anuran tadpole – Evolution and Maintenance. In: McDiarmid, R.W., Altig, R. (Ed.). Tadpoles – The biology of anuran larvae. Chicago, IL: University of Chicago Press. 280-294.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendonza, M., Noriega, N., Stuart, A.A.; Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. PNAS. 99:8, 5476-5480.
- Hickman, Jr., C. P., Roberts, L., Larson, A., 2001. Homeostasis, osmotic regulation, Excretion, and temperature regulation. In: Hickman, Jr., C. P., Roberts, L., Larson, A., 2001. Integrated principles of zoology - 11th ed. 664-683.
- Hoffmann, D.F., Leboutte, E.M., Souza, S.M.G., 1989. Efeito da temperatura e desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). Rev. Soc. Bras. Zootec., 18:6, 557-566.
- Honrubia, M.P., Herraiez, M.P., Alvarez, R., 1993. The carbamate insecticide z-cyfluthrin induced structural-changes of gills, liver, gallbladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25:2, 184-191.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbring, C.C., Werry, K., Veldhoen, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. Environ. Toxicol. Chem., 23:1928-1938.
- Hyne, R.V., Spolyarich, N., Wilson, S.P., Patra, R.W., Byrne, M., Gordon, G., Sánchez-Bayo, F., Palmer, C.G., 2009. Distribution of frogs in rice bays within an irrigated agricultural area: links to pesticide usage and farm practice. Environ. Toxicol. Chem., 28:6, 1255–1265.
- IGC. Grain Market Report, October 2012. International Grains Council (IGC), London, UK. N°. 427.
- Johansson, M., Piha, H., Kylin, H., Merilla, J., 2006. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. Environ. Toxicol. Chem., 3164-3169.
- Kadry, S.M., Marzouk, M.S., Amer, A.F., Hanna, M.I., Azmy, A.H., Hamed, H.S., 2012. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish. 16:2, 83-98.
- Khan, M.Z., Tabassum, R., Naqvi, S.N.H., Shah, E Z., Tabassum, F., Ahmad, I., Fatima, F., Khan, M.F., 2003. Effect of cypermethrin and permethrin on cholinesterase activity and protein contents in *Rana tigrina* (amphibia). Turk. J. Zool. 27, 243-246.

- Knoop, R., Ferreira, C.M., Takahashi, N.S., França, F.M., Antonucci, A.M., Teixeira, P.C., Sugohara, A., Dias, D.C., Tachibana, L., Hipolito, M., 2011. Influência da incorporação de vitamina C à dieta no desempenho produtivo de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* pós-metamorfoseadas. Bol. Inst. Pesca, 37:4, 383-391.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C., 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: b-esterases and glutathione s-transferase inhibitors. Arch Environ Contam Toxicol., 60:681–689.
- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Hela, G.D., Albanis, T.A., 2002. Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the kalamas river (N.W. Greece). J. Chromatogr., 963, 107-116.
- Landis, W.G., Yu, M.H., 2003. Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems: 3rd ed. Crc press. Boca Raton, Flórida. 509p.
- Landys, M.M., Piersma, T., Guglielmo, C.G., Jukema, J., Ramenofsky, M., Wingfield, J.C., 2005. Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. Proc. Roy Soc. B. 272,295-302.
- Langerveld, A.J., Celestine, R., Zaya, R., Mihalko, D. Ide, C.F., 2009. Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related unctions in developing *Xenopus laevis* tadpoles. Environ. Res., 379–389.
- Larini, L., 1999. Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole, 230 p.
- Lasram, M.M., Annabi, A.B., Elj, N.E., Selmi, S., Kamoun, A., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2009. Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats. Journal of Hazardous Materials, 163, 1052–1055.
- Lefebvre, I., 2010. Impact des polluants agricoles sur la génétique des populations d'une espèce sentinelle: le ouaouaron (*Rana catesbeiana*). Dissertação de Mestrado - Département de Sciences Biologiques Faculté Des Arts Et Des Sciences - Université de Montréal, 70p.
- Lima, S. L., Agostinho C. A., 1992. A tecnologia de criação de rãs. Editora Imprensa Universitária/UFV, Viçosa, Brasil, 168p.
- Lima, L. C., Ribeiro, L. P., Leite, R. C., Melo, D. C., 2006. Estresse em peixes. Rev. Bras. Reprod. Anim., 30, 113-117.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. Env. Pollution, 157, 2903–2927.
- Marcantonio, A.S., 2005. Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* SHAW, 1802: Toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal/SP. 92p.
- Marchezan, E., Zanella, R., Avila, L.A., Camargo, E.R., Machado, S.L.O., Macedo, V.R.M., 2007. Rice herbicide monitoring in two brazilian river during the rice growing season. Sci. Agric., 64, 131-137.
- Massoud, A.S.D.A.H., El-Fakhrany, I.I., Allah, M.S.S., 2011. Toxicological effects of organosporus insecticides and remediation technologies of its residues in aquatic system B. dimethoate. J. Agric. Res. Kafer El-Sheikh Univ., 37:3, 516-533.
- Menezes, C.C., Leitemperger, J., Santi, A., Lópes, T., Veiverberg, C.A., Peixoto, S., Adaim, M.B., Zanella, R., Barbosa, N.B.V., Loro, V.L., 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.

- Midio, A.F., Martins, D.I., 1997. Herbicidas em alimentos: aspectos gerais, toxicológicos e analíticos. São Paulo: Livraria Varela, 109p.
- Miron, D. S., Da Silva, L.V.F., Golombieski, J.I., Machado, S.L.O., Marchezan, E., Baldisserotto, B., 2004. Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Ciência Rural*, 34:5, 1465-1469.
- Miron, D.S., 2009. Respostas metabólicas e enzimáticas em Jundiás *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) e piavas *Leporinus obtusidens* (Anostomidae) expostos a herbicidas utilizados na cultura do arroz irrigado. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria – Bioquímica Toxicológica Santa Maria, RS, Brasil, 113 p.
- Modesto, K.A., Martinez, C., 2010. Effects of roundup transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. 781-787.
- Moreira, J.C., Jacob, S.C., Peres, F., Lima, J.S., Meyer, A., Oliveira-Silva J.J., Sarcinelli, P.N. *et al.*, 2002. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7:2, 299-311.
- Moura, M.A.M., Franco, D.A.S., Matallo, M.B., 2008. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. *Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária*. 142-151.
- Moyes, C.D., Schulte, P.M., 2010. Princípios De Fisiologia Animal. Porto Alegre: Artmed. 526-571.
- Murphy, J.E., Phillips, C.A., Beasley, V.R., 2000. Aspects of amphibian ecology. In: Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A. Eds. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Setac Press, Pensacola, FL, 141-178.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8, 3298-3312.
- Oba, E.T., Mariano, W.S., Santos, L.R.B., 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo sustentável. In: Tavares-Dias, M. (org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá. 389-424.
- Oga, S., 2003. *Fundamentos de Toxicologia – 2 ed.* São Paulo: Atheneu Editora, 677p.
- Oliveira JR., R.S., 2001. Mecanismos de ação de herbicidas. In: Oliveira Jr., R. S. *Plantas daninhas e seu manejo*. Maringá, Paraná: Napd – Um. 364p.
- Patil, J.A., Patil, A.J., Sontakke, A.V., Govindwar. S.P., 2009. Oxidative stress and antioxidants status of occupational pesticides exposed sprayers of grape gardens of western maharashtra (india). *J. Environ. Health Res.*, 9:2, 81-89.
- Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 86, 1-7.
- Păunescu, A., Ponepal, C.M., 2011. Effect of roundup® herbicide on physiological indices in marsh frog *Pelophylax ridibundus*. *Scientific Papers, Uasvm Bucharest.*, 269-274.
- Poleza, F., Souza, R.C., Stramosk, C.A., Rorig, L.R., Resgalla JR., C. 2008. Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *Vibrio Fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande Do Sul. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e meio ambiente*, 18, 107-114.
- Rambabu, J.P., Rao, M.B., 1994. Effect of organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (muk ller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53, 142-148.

- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15:2, 618-627.
- Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 131-138.
- Rocha, G.C., Ferreira, C.M., Teixeira, P.C., Dias, D.C., França, F.M., Antonucci, A.M., Marcantonio, A.S., Lauretto, M., 2010. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesq. Vet. Bras.*, 30:10, 891-896.
- Rodriguez-Serna, M., Flores-Nava, A., Olvera-Novoa, M.A., Carmona-Osalde, C., 1996. Growth and production of Bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, at three stocking densities in a vertical intensive culture system. *Aquacultural Engineering*, 15:4, 233-242.
- Roy, S., Hanninen, O., 1993. Biochemical monitoring of the aquatic environment: possibilities and limitations. In: M. Richardson (Ed.), *Ecotoxicology monitoring: VCH-Verlag*, p.119-135.
- Sahib, I.K., Rao, K.R., Rao, K.V., 1984. Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters), as measured through incorporation of [¹⁴C] amino acids. *Toxicol. Lett.* 20:1, 63-67.
- Sak, O., Uçkan, F., Ergin, E., 2006. Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Belg. J. Zool.* 136:1, 53-58.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 58:3, 740-5.
- Sasikala, G., Palanisamy, P., Mallikaraj, D., Bhuvaneshwari, N., Natarajan, G.M., 2011. Biochemical modulations induced by metasystox in fresh water snakeheaded fish *Channa striata* blood. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2:2, 772-774.
- Sawant, V.A., Varute. A.T., 1973. Lipid changes in the tadpoles of *Rana tigrina* during growth and metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 44, 729-750.
- Sayim, F., 2008. Acute toxic effects of malathion on the 21st stage larvae of the marsh frog. *Turk. J. Zool.*, 99-106.
- Shakoori, A.R., Mughal, A.L., Iqbal, M.J., 1996. Effects of sublethal doses of fenvalerate (a synthetic pyrethroid) administered continuously for four weeks on the blood, liver and muscles of a freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 487-494.
- Silva, M.D., Peralba, M.C.R., Mattos, M.L.T., 2003. Pesticidas. R. *Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 13-19.
- Silva, D.R.O., Avila, L.A., Agostinetto, D., Dal Magro, T., Oliveira, E., Zanella, R., Noldin, J.A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ci. Rural*, 39, 2383-2389.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Kenneth, R.D., Klaine, S.J., Lapoint, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall Jr, L.W., Williams, W.M., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North american surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:1, 31-76.
- Sounderraj, S.F.L., Sekhar, P., Kumar, P.S., Lesley, N., 2011. Effect of systemic pesticide phosphamidon on haematological aspects of common frog *Rana tigrina*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2:6, 1776-1780.

- Spadotto, C.A., 2006. Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras. Documentos, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente. 58, 20p.
- Stebbins, R.C., Cohen, N.W., 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press. New Jersey. 316p.
- Stenersen, J., 2004. Chemical pesticides: mode of action and toxicology. Crc Press. Boca Raton, Flórida. 276p.
- Streit, B., 1992. Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia*, 48, 955-970.
- Tiwari, S., Singh, A., 2003. Control of common freshwater predatory fish, *Channa punctatus*, through *Nerium indicum* leaf extracts. *Chemosphere*, 53, 865–875.
- Triebkorn, R., Christensen, K., Heim, G., 1998. Effects of orally and dermally applied metaldehyde on mucus cells of slugs (*Deroceras reticulatum*) depending on temperature and duration of exposure. *J. Mollus. Stud.*, 64:4, 467-487.
- Tomlin, C., 1994. The pesticide manual - incorporating the agrochemicals handbook – Tenth Edition. British Council: Cambridge/UK, 1341p.
- Uchendu, C., Ambali, S.F., Ayo, J.O., 2012. The organophosphate, chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: a review. *Afr. J. Agric. Res.* 7:18, 2720-2728.
- Upasani, C.D., Balaraman, R., 2001. Effect of vitamin e, vitamin c and spirulina on the levels of membrane bound enzymes and lipids in some organs of rats exposed to lead. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 185-191.
- US Environmental Protection Agency, 1985. EPA draft final list of recommendation for chemicals in the National Survey for Pesticides in Groundwater. *Chem. Regul. Rep.*, 9, 1033.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry*. 11, 256-265.
- Venkataramana, G.V., Sandhya Rani, P.N., Murthy, P.S., 2006. Impact of malathion on the biochemical parameters of gobiid fish, *Glossogobius giuris* (Ham). *Journal of Environmental Biology*, 27:1, 119-122.
- Vizotto, L.D., 1979. Aspectos técnicos da ranicultura. In: Encontro Nacional De Ranicultura, 1, Brasília, DF. Anais... Brasília: Ministério da Agricultura, 28-69.
- Volpato, G.L., Frioli, P.M.A., Carrieri, M.P., 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a general view about the causal mechanisms. *Bol. Fisiol. Anim.*, 13: 07-22.
- Vutukuru, S.S., 2005. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. 2, 456-462.
- Wang, X., Dong, Y., Wang, L., Han, S., 2001. Acute toxicity of substituted to *Rana japonica* tadpoles and mechanism –based quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *Chemosphere*, 44, 447-455.
- Weissman, C., 1990. The metabolic response to stress: an overview and update. *Anesthesiology*, 73, 308-27.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77:3, 592-625.

- Wright, M.L., Richardson, S.E., Bigos, J.M., 2011. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: Changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160: 498–503.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*. 3. ed. prentice-hall, Londres. 944p.
- Zaya, R.M., Amini, Z., Whitaker, A.S., Kohler, S.L., Ide, C.F., 2011. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquat. Toxicol.*, 104, 243-253.

ANEXO

I

Certificado

Data: 07/01/2013

Para: Michele Dornelles

De: Denise Arend - Scientific Linguagem

Ref.: Certificação de revisão

Certifico para os devidos fins que os artigos "Effect of herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac on the biochemical composition, lipid peroxidation, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)" e "Evaluation of metabolic parameters and lipid peroxidation in bullfrog tadpoles exposed to low concentrations of atrazine, glyphosate and quinclorac" foram revisados por profissional qualificado.

Fico à disposição para qualquer alteração que se faça necessária.

Obrigada,



Denise Arend
Scientific Linguagem
denise@scientific.com.br
(51) 30120575
www.scientific.com.br

ANEXO

II

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Seguem abaixo as normas para autores para possíveis revistas a serem encaminhados os artigos presentes nesta dissertação, sendo para o artigo “Effect of herbicides atrazine, glyphosate and quinclorac on the biochemical composition, lipid peroxidation, and survival in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)” o possível encaminhamento à Revista Biological Conservation, para o artigo “Evaluation of metabolic parameters and lipid peroxidation in bullfrog tadpoles exposed to low concentrations of atrazine, glyphosate and quinclorac” o possível encaminhamento para a Revista Aquatic Toxicology, e para o artigo “Implicações dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a metamorfose e a sobrevivência em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia: Anura, Ranidae)” o possível encaminhamento para a Revista Brasileira de Zoologia.



NORMAS DE PUBLICAÇÃO BIOLOGICAL CONSERVATION

AUTHOR INFORMATION PACK

DESCRIPTION

Biological Conservation is an international leading journal in the discipline of **conservation biology**. The journal publishes articles spanning a diverse range of fields that contribute to the **biological, sociological, and economic dimensions of conservation and natural resource management**. The primary aim of *Biological Conservation* is the publication of high-quality papers that advance the science and practice of conservation, or which demonstrate the application of conservation principles for natural resource management and policy. Therefore it will be of interest to a broad international readership. *Biological Conservation* invites the submission of research articles, reviews (including systematic reviews and perspectives), short communications and letters to the editor dealing with all aspects of **conservation science**, including theoretical and empirical investigations into the consequences of **human actions for the diversity, structure and function of terrestrial, aquatic or marine ecosystems**. Such papers may include quantitative assessments of extinction risk, fragmentation effects, spread of invasive organisms, conservation genetics, conservation management, global change effects on biodiversity, landscape or reserve design and management, restoration ecology, or resource economics. The journal's coverage of interdisciplinary topics within conservation biology is highly relevant to **scientists** at academic, research and non governmental institutions. The journal also provides practical applications of conservation research for **land/resource managers** and **policy makers** charged with protecting biological diversity and ultimately implementing conservation science into conservation practice.

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Please read all information carefully and follow the instructions in detail when preparing your manuscript.

Manuscripts that are not prepared according to our guidelines will be sent back to authors without review.

Biological Conservation encourages the submission of high-quality manuscripts that advance the science and practice of conservation, or which demonstrate the application of conservation principles for natural resource management and policy. Given the broad international readership of the journal, published articles should have global relevance in terms of the topics or issues addressed, and thus demonstrate applications for conservation or resource management beyond the specific system or species studied.

Types of paper

Word counts include text, references, figures and tables. Each figure or table should be considered equal to 300 words.

1. Full length articles (Research papers)

Research papers report the results of original research. The material must not have been previously published elsewhere. Full length articles are usually up to 8,000 words.

2. Review articles

Reviews should address topics or issues of current interest. They may be submitted or invited. Review articles are usually up to 12,000 words and must include a Methods section explaining how the literature for review was selected.

3. Systematic reviews:

A systematic review applies a methodology to collect together and appraise the scientific evidence on a specific question or hypothesis. Its main strengths are the transparent approach to minimizing bias in considering importance of data. For a more elaborate explanation of systematic reviews, please check the following link: <http://www.environmentalevidence.org/Authors.htm>. Systematic reviews should not exceed 8,000 words. Although the manuscript should report the main outcomes of the systematic review, it is expected that the full review and associated data will be made available online. Authors who intend to conduct a systematic review and submit a manuscript are kindly advised to contact Reviews Editor Andrew Pullin (a.s.pullin@bangor.ac.uk) at an early stage. Initial guidance can be crucial in ensuring that the review qualifies as a systematic review.

4. Perspectives

These articles provide an opportunity for authors to present a novel, distinctive, or even personal viewpoint on any subject within the journal's scope. The article should be well grounded in evidence and adequately supported by citations but may focus on a stimulating and thought-provoking line of argument that represents a significant advance in thinking about conservation problems and solutions. Perspectives articles should not exceed 8000 words.

5. Short communications

Short communications are meant to highlight important research that is novel or represents highly significant preliminary findings, and should be less than 4,000 words.

6. Book Reviews

Book reviews will be included in the journal on a range of relevant titles that are not more than two years old. These are usually less than 2,000 words. Please submit your requests/ideas to Dave Aplin at dave@botanicalvalues.com.

7. Letters to the Editor

AUTHOR INFORMATION PACK 28 Sep 2012 www.elsevier.com/locate/biocon 5

Letters to the editor are written in response to a recent article appearing in the journal. Letters should be less than 800 words, with references kept to a minimum (three or fewer references).

8. Special Issue papers

Biological Conservation accepts special issue proposals. Please complete the special issue proposal form and send it to the Editor-in-Chief Richard Primack at primack@bu.edu



**AQUATIC TOXICOLOGY
AUTHOR INFORMATION PACK
TABLE OF CONTENTS**

ISSN: 0166-445X

DESCRIPTION

Aquatic Toxicology publishes original scientific papers dealing with the mechanisms of toxicity and the responses to toxic agents in aquatic environments at the community, species, tissue, cellular, subcellular and molecular levels, including aspects of uptake, metabolism and excretion of toxicants. The aim of the journal is to increase our understanding of the impact of toxicants on aquatic organisms and ecosystems. Studies with aquatic model systems that provide fundamental mechanistic insight to toxic effects on organisms in general are also welcome. Both laboratory and field studies will be considered. The mechanistic focus includes genetic disturbances and adaptations to environmental perturbations, including the evolution of toxicant responses; biochemical, physiological and behavioural responses of organisms to toxicants; interactions of genetic and functional responses, and interactions between natural and toxicant-induced environmental changes. The bioaccumulation of contaminants is considered when studies address mechanisms influencing accumulation. Ecological investigations that address reasons, possibly also considering their genetic and physiological aspects, for toxicant-induced alterations of aquatic communities or populations are suitable. Reports on technique development or monitoring efforts are generally not within the scope of *Aquatic Toxicology*, except those concerning new methodologies for mechanistic research with an example of their application. Identification of toxicants or toxicologically relevant molecules in organisms will be considered only if the identification is a part of a more comprehensive mechanistic study. Whenever possible, information of exposure should be based on measured concentrations and not nominal or assumed ones. Manuscripts reporting acute toxicity data (lethal concentration, LC-50 or lethal dose, LD-50) as a major finding are usually not considered.

AUDIENCE

Environmental Toxicologists, Marine Biologists, Ecotoxicologists, Biochemical Toxicologists, Conservationists.

IMPACT FACTOR

2011: 3.761 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

AUTHOR INFORMATION PACK 10 Sep 2012 www.elsevier.com/locate/aqtox 2

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS, Chemical Abstracts, Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences, EMBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, GEOBASE, Marine Science, Contents Tables, Scopus

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers), 2. Review Articles, 3. Short Communications, 4. Letters to the Editor

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles can be divided into three types:

- *Regular reviews* covering subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. These should generally not exceed 12 printed pages (approx. 6000 words).

- *Mini-reviews*. These will be short reviews or overviews (not exceeding 2-3 printed pages, approx. 1000-1500 words) on topics of above-average emerging interest.

- *Commentaries*. This label will be given to mini-reviews which clearly contain the personal opinions of the author concerned. All types of review articles will be solicited by the Reviews Editor, Prof. M.N. Moore, Plymouth Marine Laboratory, Prospect Place, The Hoe, Plymouth, PL1 3DH, UK. E-mail: mnm@pml.ac.uk.

Short Communications will be restricted to papers describing short, complete studies. They should not exceed 3 printed pages, including figures and tables (approx. 1500 words), and should be written in a continuous style, without subdivisions of introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgements; they should always begin with a summary. A short communication, although brief, should be a complete and final publication, and figures and tables from the communication should not occur in a later paper.

Letters to the Editor should either offer comment on a paper published in the journal, or comment on any general matter providing that this is relevant to the scope of the journal. In the case of letters commenting on published papers, the author(s) of the latter will be given the opportunity to react to

the letter and the two items will subsequently be published together in the journal.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association*

(*Declaration of Helsinki*) for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm> ; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals*

<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm> . This must be stated at an appropriate point in the article.

Language Services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Authors who require information about

language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqtox/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Aquatic Toxicology has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

AUTHOR INFORMATION PACK 10 Sep 2012 www.elsevier.com/locate/aqtox 6

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

AUTHOR INFORMATION PACK 10 Sep 2012 www.elsevier.com/locate/aqtox 7

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they

should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

AUTHOR INFORMATION PACK 10 Sep 2012 www.elsevier.com/locate/aqtox 9

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo e política
- Forma e preparação de manuscritos

ISSN 0101-8175 *versão impressa*

ISSN 1806-969X *versão online*

Escopo e política

INFORMAÇÕES GERAIS

A **Revista Brasileira de Zoologia**, órgão da Sociedade Brasileira de Zoologia (SBZ), destina-se a publicar artigos científicos originais em Zoologia de seus sócios. Todos os autores deverão ser sócios e estarem quites com a tesouraria, para poder publicar na Revista.

Artigos redigidos em outro idioma que não o português, inglês ou espanhol poderão ser aceitos, a critério da Comissão Editorial.

Copyright

É permitida a reprodução de artigos da revista, desde que citada a fonte. O uso de nomes ou marcas registradas etc. na publicação não implica que tais nomes estejam isentos das leis e regulamentações de proteção pertinentes. É vedado o uso de matéria publicada para fins comerciais.

Forma e preparação de manuscritos

MANUSCRITOS Devem ser acompanhados por carta de concessão de direitos autorais e anuência, modelo disponível no [site da SBZ](#), assinada por todos os autores. Os artigos devem ser enviados em três vias impressas e em mídia digital, disquete ou CD, em um único arquivo no formato PDF, incluindo as figuras e tabelas. O texto deverá ser digitado em espaço duplo, com margens esquerda e direita de 3 cm, alinhado à esquerda e suas páginas devidamente numeradas. A página de rosto deve conter: 1) título do artigo, mencionando o(s) nome(s) da(s) categoria(s) superior(es) à qual o(s) animal(ais) pertence(m); 2) nome(s) do(s) autor(es) com endereço(s) completo(s), exclusivo para recebimento de correspondências, e com respectivos algarismos arábicos para remissões; 3) resumo em inglês, incluindo o título do artigo se o mesmo for em outro idioma; 4) palavras-chave em inglês, no máximo cinco, em ordem alfabética e diferentes daquelas utilizadas no título; 5) resumo e palavras-chave na mesma língua do artigo, ou em português se o artigo for em inglês, e equivalentes às do resumo em inglês. O conjunto de informações dos itens 1 a 5 não deve exceder a 3500 caracteres considerando-se espaços.

Os nomes de gênero(s) e espécie(s) são os únicos do texto em itálico. A primeira citação de um taxa no texto, deve vir acompanhada do nome científico por extenso, com autor e data, e família.

Citações bibliográficas devem ser feitas em caixa alta reduzida (Versalete) e da seguinte forma: Smith (1990), Smith (1990: 128), Lent & Jurberg (1965), Guimarães *et al.* (1983), artigos de um mesmo autor ou sequências de citações devem ser arrolados em ordem cronológica.

ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Fotografias, desenhos, gráficos e mapas serão denominados figuras. Desenhos e mapas devem ser feitos a traço de nanquim ou similar. Fotografias devem ser nítidas e contrastadas e não misturadas com desenhos. A relação de tamanho da figura, quando necessária, deve ser apresentada em escala vertical ou horizontal.

As figuras devem estar numeradas com algarismos arábicos, no canto inferior direito e chamadas no texto em ordem crescente, devidamente identificadas no verso,

obedecendo a proporcionalidade do espelho (17,0 x 21,0 cm) ou da coluna (8,3 x 21,0 cm) com reserva para a legenda.

Legendas de figuras devem ser digitadas logo após à última referência bibliográfica da seção Referências Bibliográficas, sendo para cada conjunto um parágrafo distinto.

Gráficos gerados por programas de computador devem ser inseridos como figura no final do texto, após as tabelas, ou enviados em arquivo em separado. Na composição dos gráficos usar fonte Arial. Não utilizar caixas de texto.

Figuras em formato digital devem ser enviadas em arquivos separados, no formato TIF com compactação LZW. No momento da digitalização utilizar as seguintes definições mínimas de resolução: 300 ppp para fotos coloridas ou em tons de cinza; 600 ppp para desenhos a traço. Não enviar desenhos e fotos originais quando da submissão do manuscrito.

Tabelas devem ser geradas a partir dos recursos de tabela do editor de texto utilizado, numeradas com algarismos romanos e inseridas após a última legenda de figura. O cabeçalho de cada tabela deve constar junto à respectiva tabela.

Figuras coloridas poderão ser publicadas com a diferença dos encargos custeada pelo(s) autor(es).

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos, indicações de financiamento e menções de vínculos institucionais devem ser relacionados antes do item Referências Bibliográficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As Referências Bibliográficas, mencionadas no texto, devem ser arroladas no final do trabalho, como nos exemplos abaixo.

Periódicos devem ser citados com o nome completo, por extenso, indicando a cidade onde foi editado.

Não serão aceitas referências de artigos não publicados (ICZN, Art. 9).

Periódicos

Nogueira, M.R.; A.L. Peracchi & A. Pol. 2002. Notes on the lesser white-lined bat, *Saccopteryx leptura* (Schreber) (Chiroptera, Emballonuridae), from southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 19 (4): 1123-1130.

Lent, H. & J. Jurberg. 1980. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma Laporte*, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 40 (3): 611-627.

Smith, D.R. 1990. A synopsis of the sawflies (Hymenoptera, Symphita) of America South of the United States: Pergidae. *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 34 (1): 7-200.

Livros

Hennig, W. 1981. *Insect phylogeny*. Chichester, John Wiley, XX+514p.

Capítulo de livro

Hull, D.L. 1974. Darwinism and historiography, p. 388-402. In: T.F. Glick (Ed.). *The comparative reception of Darwinism*. Austin, University of Texas, IV+505p.

Publicações eletrônicas

Marinoni, L. 1997. Sciomyzidae. In: A. Solís (Ed.). *Las Familias de insectos de Costa Rica*. Disponível na World Wide Web em: <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/Texto630.html> [data de acesso].