



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

PAOLA FLORES STURZA

TOXIDADE AGUDA E CRÔNICA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EXPOSTOS À ATRAZINA E TEBUCONAZOLE

ERECHIM

2017

PAOLA FLORES STURZA

**TOXIDADE AGUDA E CRÔNICA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EXPOSTOS À ATRAZINA E TEBUCONAZOLE**

Dissertação de Mestrado apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadores: Prof^a Dra. Marília Teresinha Hartmann e Prof^o Dr. Paulo Afonso Hartmann.

Co-Orientação: Prof^a Dra. Vânia Lucia Loro.

ERECHIM

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

ERS 135, Km 72, nº 200

CEP: 99700-000

Zona Rural

Erechim - RS

Brasil

Sturza, Paola Flores

TOXIDADE AGUDA E CRÔNICA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EXPOSTOS À ATRAZINA E TEBUCONAZOLE/ Paola Flores Sturza. -- 2017.

99 f.:il.

Orientador: Marília Teresinha Hartmann; Paulo Afonso Hartmann.

Co-orientador: Vânia Lucia Loro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) , Erechim, RS , 2017.

1. Toxicologia. 2. Anfíbios. 3. Mortalidade. 4. Alterações morfológicas. 5. Estresse oxidativo. I. Hartmann, Marília Teresinha Hartmann; Paulo Afonso, orient. II. Loro, Vânia Lucia, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

PAOLA FLORES STURZA

**TOXIDADE AGUDA E CRÔNICA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EXPOSTOS À ATRAZINA E TEBUCONAZOLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadores: Prof^a Dra. Marília Teresinha Hartmann e Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Vânia Lucia Loro.

Esta dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra. Marília Teresinha Hartmann
Orientadora

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann
Orientador

Prof^a Dra. Vania Lucia Loro
Co-Orientadora - UFSM

Prof. Dra. Sonia Zanini Cechin - UFSM

Prof. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin - UFFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela realização de mais esta etapa.

À minha orientadora Professora Dra. Marília Teresinha Hartmann.

Ao meu orientador Professor Dr. Paulo Afonso Hartmann.

A minha Co-orientadora Professora Dra. Vânia Lucia Loro pela oportunidade.

A banca examinadora, por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho.

Aos professores e colegas do mestrado que contribuíram ao longo dessa caminhada.

Agradeço a pessoas muito especiais na minha vida, que se fizeram presentes em todos os momentos, meus pais José e Cinara, meu irmão José Henrique e ao meu namorado Alécio.

Agradeço em especial aos amigos do Laboratório de Ecologia e Conservação, Guilherme Vanzetto, Juliana Wrublewski, Camila Rutkoski, Grégori Bieniek, Jessica Slaviero, Cassiane Kolcenti e Natani Macagnan, pelas contribuições e apoio na execução da pesquisa.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Toxicologia Aquática da Universidade Federal de Santa Maria pelo acolhimento, em especial a Jossiele Leitemperger pelos ensinamentos.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

Os agrotóxicos, representados por substâncias químicas, também conhecidas por agroquímicos tem objetivo de controlar as pragas agrícolas. Entretanto podem ser prejudiciais aos sistemas biológicos de diversos organismos aquáticos, incluindo os anfíbios anuros. Por isso é importante avaliar efeitos através de teste toxicológicos que fornecem informações sobre a resposta a contaminantes em um organismo. Este estudo avaliou os efeitos toxicológicos causados a espécie de anfíbio anuro *Physalaemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina e ao fungicida tebuconazole. Para tal, foram coletadas as desovas totais direto da natureza com menos de 24 horas de oviposição, transportadas até o laboratório onde foram mantidas em condições controladas para seu desenvolvimento. Foi realizado teste de toxicidade aguda de 96 horas para determinação da $CL_{50\ 96h}$ e teste crônico, onde se avaliou a mortalidade, alterações morfológicas e alterações bioquímicas dos girinos expostos a concentrações subletais. Os cálculos da $CL_{50\ 96h}$ seguiram o método *trimmed spearman karber*, para atrazina foi de 47,90 mg/L e 1,64 mg/L para tebuconazole. A exposição a doses subletais causou alterações na morfologia oral dos girinos, como ausência de mandíbula, ausência de uma ou mais fileiras inteiras de dentículos, fileiras de dentículos tortas, dentículos falhos ou ausentes, além de inchaço no intestino. Além disso, atrazina e tebuconazole causaram efeitos indutores de dano oxidativo em girinos de *Physalaemus gracilis*. O aumento da peroxidação lipídica e proteína carbonil sugere que os danos oxidativos induzidos afetaram lipídeos e proteínas podendo causar danos à atividade enzimática devido à oxidação de proteínas.

Palavras-chave: Efeitos toxicológicos. Alterações morfológicas. Biomarcadores. Dano oxidativo.

ABSTRACT

Pesticides, represented by chemical substances, also known as agrochemicals, have the objective of controlling agricultural pests. However, they may be harmful to the biological systems of various aquatic organisms, including anuran amphibians. It is important to evaluate effects through toxicological tests that provide information on the response to contaminants in an organism. This study evaluated the toxicological effects caused to species of anuran amphibian *Physalaemus gracilis* exposed to the herbicide atrazine and the fungicide tebuconazole. For this, the total direct nature spawnings with less than 24 hours of oviposition were collected and transported to the laboratory where they were kept under controlled conditions for their development. After that was performed the acute toxicity test for 96 hours to determine the LC_{50} and, subsequently, the chronic test, where mortality, morphological alterations and biochemical alterations of tadpoles exposed to sublethal concentrations were evaluated. To calculate the LC_{50} was employed the trimmed spearman karber method. The LC_{50} for atrazine was 47.90 mg/L, meanwhile for tebuconazole was 1.64 mg/L. The exposure to sublethal doses caused changes in the oral morphology of tadpoles, such as absence of jaw, absence of one or more whole rows of denticles, rows of crooked teeth, missing or missing teeth, and edema of the intestine. In addition, atrazine and tebuconazole caused oxidative damage inducing effects on *Physalaemus gracilis* tadpoles. The occurrence of lipid peroxidation and carbonyl proteins suggest oxidative damage of the lipids and proteins.

keywords: Toxicological effects. Morphological changes. Biomarkers. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Indivíduo adulto de <i>Physalaemus gracilis</i>	27
Figura 2: Coleta de desovas de <i>Physalaemus gracilis</i> (Anura: Leptodactylidae), município de Erechim, RS. Outubro, 2015	28
Figura 3: Mortalidade de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes concentrações (mg/L) de atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.	32
Figura 4: Mortalidade de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes concentrações (mg/L) de tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.	32
Figura 5: Mortalidade de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes tempos (h) aos agrotóxicos atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão	33
Figura 6: Mortalidade de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes tempos (h) aos agrotóxicos tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão	33
Figura 7: Mortalidade do teste crônico de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes concentrações (mg/L) de atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.	35
Figura 8: Mortalidade do teste crônico de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes concentrações (mg/L) de tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.....	35
Figura 9: Mortalidade do teste crônico de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes tempos (dias) a atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão	36
Figura 10: Mortalidade do teste crônico de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a diferentes tempos (dias) a tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão	36
Figura 11: Girino de <i>Physalaemus gracilis</i> do controle, sem alterações morfológicas	40

Figura 12: Girino de <i>Physalaemus gracilis</i> com alteração morfológica. Dentículos falhos na fileira anterior.....	40
Figura 13: Girino de <i>Physalaemus gracilis</i> com alterações na morfologia oral. A. Ausência de fileiras inteiras de dentículos na parte anterior e inferior, ausência de lábios posterior. B. Ausência de fileiras inteiras de dentículos na parte anterior e fileiras de dentículos tortas.....	40

CAPÍTULO II

Figura 1: A. Indivíduo adulto de <i>Physalaemus gracilis</i> . B. Girino de <i>Physalaemus gracilis</i>	62
Figura 2: - Atividade AChE em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	67
Figura 3: Atividade AChE em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	68
Figura 4: Atividade GST em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	69
Figura 5: Atividade GST em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	69
Figura 6: Atividade SOD em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	70
Figura 7: Atividade SOD em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6).	

Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	70
Figura 8: NPSH em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	71
Figura 9: NPSH em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	71
Figura 10: Carbonil em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	72
Figura 11: Carbonil em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	72
Figura 12: TBARS em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	73
Figura 13: TBARS em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).....	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Detalhamento dos agrotóxicos utilizados. UFFS, Campus Erechim, 2016.....	26
Tabela 2: Mortalidade de <i>Physalaemus gracilis</i> e concentração letal de atrazina e tebuconazole no teste de exposição aguda. UFFS, Campus Erechim, 2016.....	31
Tabela 3: Mortalidade de <i>Physalaemus gracilis</i> no teste de exposição crônica a atrazina e tebuconazole. UFFS, Campus Erechim, 2016.....	34
Tabela 4: Dados morfológicos dos parâmetros comprimento e massa dos girinos no teste crônico após 21 dias de exposição. UFFS, Campus Erechim, 2016.....	38
Tabela 5: Número de alterações morfológicas em <i>Physalaemus gracilis</i> para cada concentração de atrazina e tebuconazole em exposição crônica. Um indivíduo pode apresentar mais de um tipo de alteração. UFFS, Campus Erechim, 2016.	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Tabela de classificação de Gosner (1960).

Anexo B: Autorização da Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Anexo C: Autorização para atividades com finalidade científica pelo ICMBio.

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolisterase

ASCH - Ascorbato

CDNB - 1-cloro-2 , 4-dinitrobenzeno

CL50 - Concentração Letal Média

CL50 96h - concentração letal que causa a mortalidade de 50% da população em 96 horas

CRC – comprimento rostro-cloacal

DNPH - 2,4-dinitrofenil-hidrazina

DTNB - 5,5'-ditio-bis-nitrobenzóico-ácido-2

EROs - espécies reativas ao oxigênio

ES – concentrado emulsionável

GPx - glutational peroxidase

GSH - glutational reduzida

GST - glutational S-transferase

HCl – ácido clorídrico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LC – menos preocupante

NaOH - hidróxido de sódio

NPSH - tiol não-proteico

O₂⁻: ânion superóxido

pH - potencial hidrogeniônico

SC – solução

SDS - dodecil sulfato de sódio

SOD - superóxido dismutase

TBA - ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

TFK - tampão de fosfato de potássio

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ANEXOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 REFERÊNCIAS.....	18
3 CAPÍTULOS	
3.1 CAPÍTULO 1: TOXIDADE AGUDA E EFEITOS CRÔNICO DE EXPOSIÇÃO AOS AGROTÓXICOS ATRAZINA E TEBUCONAZOLE EM GIRINOS DE <i>Physalaemus gracilis</i>	22
RESUMO	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Agrotóxicos.....	27
2.2 Espécie teste.....	27
2.3 Coleta das desovas	28
2.4 Delineamento experimental	28
2.4.1 Teste agudo.....	29
2.4.2 Teste crônico	29
2.4.3 Análise morfológica.....	30
2.4.4 Análise dos Dados	30
3 RESULTADOS	31
3.1 Teste agudo.....	31
3.2 Teste crônico	34
3.2.1 Análise Morfológica.....	37
3.2.1.1 Comprimento e massa dos girinos.....	37
3.2.1.2 Alterações morfológicas.....	38
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÃO.....	45
6 REFERÊNCIAS	46

3.2 CAPÍTULO 2: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM GIRINOS DE <i>Physalaemus gracilis</i> EXPOSTOS À ATRAZINA E TEBUCONAZOLE.	57
RESUMO	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 Agrotóxicos	62
2.2 Espécie teste	62
2.3 Teste toxicológico	62
2.4 Análises bioquímicas	63
2.4.1 Atividade AChE	63
2.4.2 Atividade GST	64
2.4.3 Atividade SOD	64
2.4.4 Níveis de NPSH	65
2.4.5 Ensaio de proteína carbonilada	65
2.4.6 Estimativa de peroxidação lipídica	65
2.5 Análises dos dados	66
3 RESULTADOS	67
3.1 Atividade AChE	67
3.2 Atividade da enzima GST	68
3.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	69
3.4 Níveis de tióis não proteicos (NPSH)	70
3.5 Proteína carbonilada	71
3.6 TBARS	72
4 DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÃO	80
6 REFERÊNCIAS	81
4 CONCLUSÕES	92
ANEXO A - Tabela de classificação de Gosner (1960).....	94
ANEXO B - Autorização da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul.....	96
ANEXO C - Autorização para atividades com finalidade científica pelo IBAMA	97

INTRODUÇÃO GERAL

A partir da década de 1950 foram observadas profundas mudanças no processo de produção agrícola com o aumento de uso de agrotóxicos e de seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana (MOREIRA et al., 2002). Tecnologias baseadas no uso extensivo de agentes químicos foram disponibilizadas para aumento da produtividade e proteção contra pragas agrícolas (MOREIRA et al., 2002). Esta gama de produtos químicos conferiu importante risco para o ambiente, pois podem chegar aos ecossistemas aquáticos superficiais e subterrâneos transportados por lixiviação de água da chuva, irrigação ou drenagem (MATAQUEIRO, 2006; ARAÚJO et al., 2016). Ao atingir os mananciais hídricos os agrotóxicos podem prejudicar o desempenho ou levar a morte de espécies aquáticas sensíveis à contaminação do ambiente (TONI et al., 2010) como insetos aquáticos, peixes e anfíbios anuros.

Os anuros estão entre os animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo (VERDADE et al., 2010). Cerca de 30% das espécies de anuros correm risco de desaparecer nos próximos anos, sendo que 35 espécies já foram extintas na natureza (IUCN, 2009). Essas ameaças se dão pela degradação dos ecossistemas explorados pelos anuros, como alteração ou eliminação dos habitats e a poluição ambiental, provocada principalmente pelo acúmulo de agrotóxicos (HADDAD, 2008). A diminuição das populações de anfíbios em todo o mundo tem sido foco de estudos que procuram investigar suas causas. Os agrotóxicos são poluentes ambientais que podem gerar importante taxa de mortalidade nos anfíbios e o declínio de algumas populações está associado à proximidade de áreas agrícolas (DAVIDSON et al., 2002).

Além disto, agrotóxicos têm sido implicados como agente principal em alguns desses declínios populacionais (EZEMONYE & TONGO, 2009). Muitas espécies de anfíbios são vulneráveis à contaminação aquática devido a exposição a estressores aquáticos e terrestres (BLAUSTEIN & KIESECKER, 2002). Em muitos casos os anfíbios completam seus ciclos de vida próximos às áreas onde os agrotóxicos são

aplicados. Além disto, para muitas espécies os estágios larvais coincidem com a época de aplicação dos agrotóxicos (BONIN et al., 1997; HAYES et al., 2003).

Dependendo da sensibilidade da espécie ao contato com o agrotóxico, pode ocorrer mortalidade, causando o declínio nas populações ou podem estar sujeitas a alterações no crescimento e reprodução, mudanças comportamentais, morfológicas e fisiológicas após exposição crônica (MONTINHO, 2013). A exposição a alguns herbicidas parece influenciar negativamente o padrão de desenvolvimento e a metamorfose em girinos diminuindo suas chances de sobrevivência (DORNELLES & OLIVEIRA, 2016). Essas alterações podem influenciar outros parâmetros biológicos, como o desenvolvimento e sucesso reprodutivo. Dessa forma, testes de toxicidade são o mecanismo para a compreensão dos efeitos de impactos sobre os compartimentos bióticos, utilizando organismos vivos que atuam como biosensores auxiliando na prevenção de impactos de um determinado poluente sobre a biota (CAIRNS et al., 1998).

Os testes de toxicidade aquática têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de efeitos deletérios em organismos aquáticos, em virtude, principalmente, do potencial risco da transferência de poluentes do ambiente para os organismos, e avaliação da qualidade da água sobre eles (FERREIRA, 2002).

Esses testes consistem de um modo geral a realização de ensaios agudos e crônicos. O ensaio de toxicidade aguda avalia os efeitos sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em curto período de tempo, geralmente de 24 à 96h (BIRGE et al., 1985).

Esses testes proporcionam rápidas respostas nas estimativas dos efeitos letais de um agente tóxico sobre o organismo (WALKER et al., 2001). Buscam avaliar o efeito de substâncias químicas isoladas ou em misturas, onde procura-se estimar a concentração - teste que causa efeito a 50% da população exposta, durante um período de tempo determinado. Tal concentração corresponde à CL50 (Concentração Efetiva ou Concentração Letal Média).

Os testes crônicos envolvem um período de exposição mais longo, entre 7 e 21 dias e refletem um cenário mais aproximado da realidade em que os organismos estão expostos aos contaminantes ambientais (AZEVEDO & CHASIN, 2003). Nos testes crônicos, as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência dos organismos, no entanto, causam distúrbios em suas funções biológicas, tais como na reprodução, desenvolvimento, crescimento e maturação (GOLDSTEIN, 1988).

A classe Amphibia (anfíbios) corresponde ao grupo que engloba os animais conhecidos como Gymnophiona (cobras-cegas), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas). Os anuros são o grupo mais diversificado no mundo, o mesmo ocorrendo no Brasil (HADDAD, 2008). Incluem 20 famílias e 90 gêneros com um total de 1039 espécies (SEGALLA et al., 2016). Os anfíbios dependem de ambientes úmidos em função da respiração cutânea e dos locais de desova (PIMENTA et al., 2014). Essa característica faz com que comumente sejam encontrados sobre o solo úmido, poças, lagos, açudes, córregos e rios.

Physalaemus gracilis é um anfíbio da família Leptodactylidae, com distribuição geográfica no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (LANGONE, 1994). É uma espécie relativamente pequena (2,7 a 3,2cm), com o focinho pontudo, coloração variável, desde o castanho avermelhado até cinza claro. As espécies deste gênero geralmente possuem uma faixa preta que vai da ponta do focinho até quase a base das coxas. Possui uma mancha arredondada na região inguinal (base da coxa). Os machos possuem a região do “papo” mais escura devido à presença do saco vocal (BORGES-MARTINS et al., 2007).

Esta espécie é classificada na Lista Vermelha como Menos Preocupantes (LC) em vista de sua ampla distribuição, tolerância a uma ampla gama de habitats, presumida grande população e não haver dados que indiquem declínio (LAVILLA et al., 2010). *Physalaemus gracilis* é terrestre, se reproduz em ninho de espuma, onde os ovos são depositados em águas temporárias naturais. A época reprodutiva ocorre nos meses de setembro a março (ACHAVAL & OLMOS, 2003). É comumente encontrada em lagoas e riachos adjacentes aos campos agrícolas, onde são aplicados agrotóxicos, que coincidem com a época de postura e desenvolvimento dos embriões (DAVID et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda e crônica e as alterações morfológicas e enzimáticas em girinos de *Physalaemus gracilis* (Leptodactylidae) quando expostos aos agrotóxicos atrazina (herbicida) e tebuconazole (fungicida).

REFERENCIAS

ACHAVAL, F.; OLMOS, A. **Anfibios y reptiles del Uruguay**. 2 ed. Graphis: Montevideo, 2003. 136 p.

ARAÚJO, M.C.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, L.C.; MACHADO, D.C.; SILVA, K.C.C.; LIMA, A.V.A.; JUNIOR, L.B.C.; BEZERRA, R.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 182-189, 2016.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima, 2003.

BLAUSTEIN, A.R.; KIESECKER, J.M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v. 5, p. 597-608, 2002.

BIRGE, W.J.; BLACK, J.A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 808-810, 1985.

BONIN, J.; DESGRANGES, J.; RODRIGUE, J.; OUELLET, M. Anuran species richness in agricultural landscapes of Quebec: Foreseeing long-term results of road call surveys. **Herpetological Conservation**, v. 1, p. 141-149, 1997.

BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F.G.; MELO, M.T.Q. 2007. Anfíbios. p. 276-291. *In*: BECKER, F.G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (orgs.) Biodiversidade: **Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 385 p.

CAIRNS, JR.J.; NIEDERLEHNER, B.R.; BIDWELL, J.R. (1998). Ecological toxicity testing. In: “ **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**”. Meyers, R.A. (ed). John Wiley & Sons, Inc.

DAVID, M.; MARIGOUDAR, S.R.; PATIL, V.K.; HALAPPA, R. (2011). Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 127–134, 2012.

DAVIDSON, C.; SHAFER, H.B.; JENNINGS, M.R. (2001). Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. **Conservation Biology**, v. 16, p. 158-160, 2002.

DORNELLES, M.F.; OLIVEIRA, G.T. (2015). Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 1610-1620, 2016.

EZEMONYE, L.; TONGO, I. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 29-36, 2009.

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas**. São Paulo: 2002. 109p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2002.

GOLDSTEIN, E.G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Revista Ambiente**, v. 2, p. 33-38, 1988.

HADDAD, C.F.B. **Uma análise da lista brasileira de anfíbios**. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Ed.). Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 287-320.

HAYES T.; HASTON K., TSUI M.; HOANG A.; HAEFELLE C.; VONK A. Atrazine induced hermorphropdism at 0.1 ppb in American Leopard frogs (*Rana pipiens*)

laboratory and field evidence. **Environmental Health Perspective**, v. 111, p. 568-575, 2003.

IUCN - **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species**. Version 2009. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 12 out. 2015.

LANGONE, J.A. **Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos)**. Museo Damaso Antonio Larrañaga, Serie de Divulgación, v. 5, p. 1-123, 1994.

LAVILLA, E.; KWET, A.; SEGALLA, M.V.; LANGONE, J.; BALDO, D. 2010. ***Physalaemus gracilis***. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T57258A11610839. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57258A11610839.en.>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

MATAQUEIRO, M.I. **Toxicidade aguda do triclorfom em Pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)**. 2006. 68 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, p. 299-311, 2002.

MOUTINHO, M.F. **Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios**. 2013. 120f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de São Paulo. São Paulo-SP. 2013.

PIMENTA, B.; COSTA, D.; MURTA-FONSECA, R.; PEZZUTI, T. **Anfíbios**: Alvorada de Minas, Conceição de Mato Dentro, Dom Joaquim: Minas Gerais. Belo Horizonte: Bicho do Mato, 2014.

SEGALLA, M.V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G.; GRANT, T.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; BERNECK, B.V.M.; LANGONE, J.A. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 5, p. 34-46, 2016.

TONI, C. **Respostas bioquímicas em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao fungicida tebuconazole (Folicur 200 EC)**. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS. 2010.

WALKER, C.; HOPKIN, S.; SIBLY, R.; PEAKALL, D. **Principles of toxicology**. Taylor & Francis, London, 2001.

VERDADE, V.K.; DIXO, M.; CURCIO, F.F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 161-172, 2010.

3.1 CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E MORTALIDADE DE GIRINOS DE *Physalaemus gracilis* EXPOSTOS À ATRAZINA E TEBUCONAZOLE

RESUMO

Os agrotóxicos têm causado diversos efeitos sobre as comunidades aquáticas. Dentre eles os herbicidas e fungicidas tem desenvolvido malformações e prejudicado o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies incluindo os anfíbios anuros. O trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade e a ocorrência de alterações morfológicas em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos à formulação comercial do herbicida atrazina e fungicida tebuconazole. As desovas foram coletadas na natureza, com menos de 24 horas de oviposição e mantidas em laboratório até atingirem o estágio larval. Foram realizados teste de toxidade aguda de 96 horas para determinar a CL_{50} , de ambos os agrotóxicos. Os testes de toxicidade crônica foram realizados na proporção de 1/10; 1/50 e 1/100 da CL_{50} 96h durante 21 dias. Ao final dos testes, foram tomadas as medidas do comprimento rostro-cloacal e massa dos girinos e analisados em estereomicroscópio a procura de alterações morfológicas. A CL_{50} 96h foi de 47,90 mg/L para atrazina e 1,64 mg/L para tebuconazole, com significativo aumento da taxa de mortalidade conforme o aumento da dose de agrotóxico. A exposição crônica produziu efeitos significativos de anomalias nas estruturas orais dos girinos em todas as concentrações testadas entre outras anomalias. Malformações morfológicas são sinais típicos de toxicidade e quando essas tem relação com a cavidade oral pode prejudicar a alimentação dos girinos e afetar a sua capacidade de sobrevivência.

Palavras-chave: Toxidade. Agrotóxicos. Anfíbios. Malformações.

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos estão entre os principais contaminantes antropogênicos que alcançam os ecossistemas aquáticos (MENNILLO et al., 2017). Diversos herbicidas e fungicidas utilizados para o controle de pragas infestantes de lavouras apresentam em sua formulação os ingredientes ativos atrazina e tebuconazole respectivamente (IBAMA, 2010). Estas substâncias podem ter efeitos nocivos sobre os organismos não alvos e interferir em parâmetros fisiológicos e morfológicos das espécies aquáticas expostas (NWANI et al., 2010).

A atrazina (6-chloro-N²-ethyl-N-4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) é um herbicida do grupo das Triazinas, apresentado sob a forma de suspensão concentrada, utilizado para controlar plantas daninhas de folhas largas e gramíneas, como milho, sorgo, cana de açúcar, entre outras culturas (EXTOXNET, 1996). O ingrediente ativo atrazina é absorvido pelas plantas através das raízes (após a germinação) e se transloca via xilema até as folhas onde provoca a inibição da fotossíntese, bloqueando o transporte de elétrons, cujos sintomas se manifestam através da clorose, necrose e morte da planta por falta de energia (ADAPAR, 2016).

Nos animais a atrazina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e após 72 horas, 65% é eliminado na urina e 15% permanece nos tecidos corporais principalmente nos fígados, rins e pulmões (CASTRO, 2009). A atrazina tem sido descrita como um interferente disruptor endócrino por aumentar a atividade da aromatase e assim afetar a sinalização do estradiol, podendo alterar o sistema reprodutor em vários organismos não alvos como os anfíbios. (ROBERGE et al., 2004; BETANCOURT et al., 2006; SANDERSON, 2006). A atrazina pode acarretar desde efeitos fisiológicos e bioquímicos, até mortalidade em girinos expostos ao herbicida em concentrações mais elevadas (EZEMONYE & TONGO, 2009). Resultados obtidos por Hayes et al. (2002) mostraram que a atrazina parece ter poucos efeitos nos anfíbios adultos e induzir anomalias e deformidades apenas em doses muito altas. Porém pode interferir na metamorfose e diferenciação sexual em doses baixas por meio de mecanismos de desregulação endócrina. Esse herbicida produz diminuição significativa na massa e diminuição no crescimento de girinos de

Physalaemus nattereri, além da presença de anormalidades morfológicas, como estruturas orais reduzidas e retração corporal (IGLESIAS, 2015).

Este herbicida é classificado como perigoso ao meio ambiente (Classe III) sendo altamente tóxico e persistente no meio ambiente (ADAPAR, 2016). O uso de atrazina é proibido na Europa, mas é permitida e utilizada em ampla escala na agricultura americana e brasileira (ACKERMAN et al., 2014), onde ocupou o sétimo lugar dos herbicidas mais comercializados no Brasil em 2014 (IBAMA, 2014). É um potencial contaminante de corpos hídricos e do solo devido as suas propriedades químicas como, grande potencial de lixiviação, alta persistência no solo e solubilidade moderada na água (EISLER, 1989). Devido a este comportamento seus resíduos podem contaminar o solo, águas subterrâneas, pequenos córregos e água de abastecimento público (ARAÚJO et al., 2016).

O tebuconazole consta entre os seis fungicidas mais comercializados no Brasil em 2009 (IBAMA, 2010). Seu uso no Brasil tem aumentado desde 2001 com o surgimento da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.), no país (GODOY et al., 2007). Tebuconazole tem ação preventiva, curativa e erradicativa indicado para o tratamento de doenças da parte aérea das culturas pela inibição da biossíntese do ergosterol em fungos (ADAPAR, 2014). O modo de ação dos fungicidas triazóis envolve a ruptura da parede e membrana celular do fungo pela inibição da lanosterol- 14 α -demethylase (CYP51). A CYP51 está presente entre as plantas, fungos e animais. Nos animais desempenha passo crítico na síntese do colesterol e na biossíntese de esteróides (TAXVIG et al., 2007).

Os efeitos ocasionados por fungicidas triazólicos indicam que um dos principais mecanismos para os efeitos no sistema endócrino envolve a alteração da enzima CYP17 envolvida na síntese de hormônios esteróides (TAXVIG et al., 2007). Eles inibem a enzima aromatase, que catalisa a conversão de andrógeno em estrógeno (HINFRAY et al., 2006). Em vertebrados a aromatase está presente no cérebro e durante o desenvolvimento, a formação local de estrógeno em determinadas regiões cerebrais atua no mecanismo de ação dos esteróides sexuais em sua ação neuroendócrina central; influenciando a diferenciação cerebral, a regulação do controle gonadotrófico e o comportamento. Consequentemente, ele pode promover alterações neurocomportamentais e reprodutivas (KINNBERG et al., 2007).

Os fungicidas podem afetar os anfíbios causando efeitos negativos como, a diminuição da sobrevivência, aumento de deformidades, metamorfose atrasada e resposta imune alterada (BERNABÒ et al., 2016). A ampla aplicação do fungicida tebuconazole traz preocupações sobre os efeitos prejudiciais sobre os ecossistemas aquáticos. Fungicidas triazólicos causam efeitos deletérios no sistema endócrino de varias espécies (TAXVIG et al., 2007; KJARSTAD et al., 2010; LIU et al., 2016).

O agrotóxico se enquadra na classe II conforme o seu potencial de periculosidade ambiental, sendo considerado muito perigoso ao meio ambiente e extremamente tóxico para organismos aquáticos (ADAPAR, 2014). O tebuconazole está entre os fungicidas mais frequentemente detectados, tanto em águas e sedimentos superficiais (HERRERO-HERNÁNDEZ et al., 2013; DE GERÓNIMO et al., 2014). Sua persistência e afinidade elevada para a adsorção no solo contamina águas superficiais e subterrâneas pelo carregamento pela chuva e adsorção pelas partículas de sedimentos (EPA, 2000).

Os anuros estão entre os animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo (IUCN, 2009; VERDADE et al., 2010). Essas ameaças se dão pela degradação dos ecossistemas explorados pelos anuros, como alteração ou eliminação dos habitats e a poluição ambiental, provocada principalmente pelo acúmulo de agrotóxicos (HADDAD, 2008). A diminuição das populações de anfíbios em todo o mundo tem sido foco de estudos que procuram investigar suas causas. Agrotóxicos têm sido implicados como agente principal em alguns desses declínios (EZEMONYE & TONGO, 2009). Muitas espécies de anfíbios são vulneráveis à contaminação aquática porque experimentam estressores aquáticos e terrestres (BLAUSTEIN & KIESECKER, 2002).

Além do declínio da riqueza de espécies e a redução de populações, a alta incidência de deformidades em anfíbios anuros tem sido relatada e pode estar relacionada à exposição a agrotóxicos (RELYEA, 2005; BRUNELLI et al., 2009; BRÜHL et al., 2013). Populações expostas a agrotóxicos tem desenvolvido malformações, incluindo crescimento prejudicado, anomalias do desenvolvimento e do comportamento (BRIDGES, 1999; BOONE & SEMLITSCH, 2002; LENKOWSKI et al., 2010; BERNABÒ, 2016). Testes realizados com diversos agrotóxicos demonstraram alterações morfológicas em várias espécies de anfíbios. Indivíduos do sapo cinza (*Hyla chrysoscelis*) expostos ao herbicida atrazina (BRISTON, 1998) apresentaram crescimento prejudicado, período mais longo para chegar a

metamorfosar e tamanhos menores. Alguns fungicidas provocaram efeitos como anormalidades na cabeça e alterações nas estruturas orais em outras espécies de anfíbios (DI RENZO et al., 2011; SVARTZ et al., 2016).

Physalaemus gracilis é um anfíbio da família Leptodactylidae ocorre no sul do Brasil, Argentina e Uruguai, e se reproduz em ninho de espuma, onde os ovos são depositados em águas temporárias naturais. A época reprodutiva ocorre nos meses de setembro a março (ACHAVAL & OLMOS, 2003). É comumente encontrada em lagoas e riachos adjacentes aos campos agrícolas, onde são aplicados agrotóxicos, que coincidem com a época de postura e desenvolvimento dos embriões (DAVID et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade da formulação comercial do herbicida atrazina e do fungicida tebuconazole em relação à ocorrência de alterações morfológicas e a mortalidade em girinos de *Physalaemus gracilis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agrotóxicos

Foram realizados testes de toxicidade aquática utilizando as formulações comerciais dos agrotóxicos, atrazina e tebuconazole (Tabela 1).

Tabela 1- Detalhamento dos agrotóxicos utilizados. UFFS, Campus Erechim, 2016.

Nome técnico	Nome comercial	Concentração de Ingrediente ativo (g/L)	Concentração de Ingrediente Inerte (g/L)	Tipo de formulação
Atrazina	Siptran®	500	600	Suspensão Concentrada (SC)
Tebuconazole	Rival 200	200	800	Concentrado Emulsionável (EC)

2.2 Espécie teste

A espécie selecionada foi *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae), conhecida popularmente por rã-chorona, com distribuição geográfica no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (LANGONE, 1994; figura 1).



Figura 1: Indivíduo adulto de *Physalaemus gracilis*. Fonte: www.ra-bugio.org.br

2.3 Coleta das desovas

As desovas foram coletadas direto na natureza, com menos de 24 horas de ovoposição até estágio 14, de acordo com a classificação de Gosner (1960), (Anexo A), em uma lagoa no campus da Universidade Federal da Fronteira Sul, localizada na Rodovia ERS 135, km 72, nº 200, Erechim – RS (Latitude: - 27.728681°; Longitude: - 52.285852°). As coletas foram realizadas entre os meses de outubro a dezembro de 2015, após períodos de chuva (Figura 2).

As desovas foram coletadas manualmente e transportadas em sacos plásticos até o Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim e mantidas separadamente em aquários de 12 litros em água de poço artesiano, previamente testada quanto à potabilidade. Os girinos foram alimentados uma vez ao dia, ad libitum, usando ração comercial para peixes ornamentais, farelada, com no mínimo 40% de proteína bruta. Os girinos não utilizados nos experimentos foram soltos na natureza novamente, no mesmo local em que foram coletados.

O estudo tem autorização do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (Anexo B) e licença do ICMBio (50398-1) (Anexo C).



Figura 2: Coleta de desovas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae), município de Erechim, RS. Outubro, 2015. Fonte: autora.

2.4 Delineamento experimental

Os testes toxicológicos foram realizados com indivíduos de *Physalaemus gracilis*, no estágio 25 de desenvolvimento de acordo com a classificação de Gosner (1960), sem nenhuma alteração morfológica ou comportamental visível, com a massa corporal média de 0,016 g $\pm$ desvio padrão (DP) 0,009 g (Amplitude (A)= 0,007 g - 0,037 g) e comprimento médio 9,97 mm $\pm$ 1,21 mm (A= 8,10 mm - 11,25 mm), N=5.

A sala de teste foi aclimatizada em 25 °C e a temperatura e oxigênio da água foram monitorados diariamente, permanecendo em 23°C $\pm$ 1°C e oxigênio dissolvido 5,0 mg/L $\pm$ 1,0 mg/L.

2.4.1 Teste agudo

Foram realizados testes de toxicidade aguda de 96 horas, para determinar a Concentração Letal Média em 96h – CL_{50 96h}. Foram utilizados recipientes de vidro estéreis com capacidade de 500 ml, onde foram colocados cinco girinos em cada um, com seis réplicas para cada tratamento, totalizando 30 girinos por concentração testada, mais seis réplicas para o controle. A cada 24 horas foram registrados o número de mortos, que foram removidos do ensaio. Os girinos não foram alimentados durante o teste agudo.

As concentrações utilizadas nos testes foram 19, 24, 29, 37, 45, 53, 60, 65, 70 e 75 mg/L de atrazina e 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg/L de tebuconazole. O controle foi realizado com mesma água utilizada em todos os aquários, sem adição de nenhum produto químico. As concentrações aplicadas foram baseadas na CL₅₀ registrada para *Physalemus cuvieri* (WRUBLEWSKI, 2016).

2.4.2 Teste Crônico

Os testes de toxicidade crônica foram realizados na proporção de 1/10; 1/50 e 1/100 da CL_{50 96h}, do teste agudo, durante 21 dias. Por isso foram utilizadas as concentrações 4,8; 1 e 0,5 mg/L para atrazina e 0,15; 0,03 e 0,01 mg/L para

tebuconazole. Os testes seguiram o mesmo delineamento experimental do teste agudo quanto ao número de girinos, réplicas, recipientes, tipo de água utilizada, temperatura, oxigênio dissolvido e registro de mortalidade. Os girinos foram alimentados uma vez ao dia durante o teste, usando o mesmo padrão da criação.

2.4.3 Análise morfológica

O comprimento rostro-cloacal (CRC) dos girinos foi medido com paquímetro digital de 0.001 mm de precisão no início e no final dos 21 dias de teste. Foi obtida a massa em gramas, registrada em balança analítica de precisão (0,0001 g). Após a conclusão foi identificado o estágio de cada animal exposto (GOSNER, 1960). Os girinos foram analisados em estereomicroscópio a procura de alterações morfológicas como deformação da cavidade oral, ausência de dentículos, ausência de fileiras de dentículos, alterações na mandíbula e deformação no corpo.

2.4.4 Análise dos Dados

Os cálculos da CL_{50} seguiram o método *trimmed spearman karber*, através do programa GBasic. Para avaliar o efeito das concentrações de atrazina e tebuconazole nos girinos foi utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) e em caso de significância foi aplicado o teste post hoc de tukey com $p < 0,05$. Para realização das análises foi utilizado o software Statistica 8.0.

3 RESULTADOS

3.1 Teste agudo

A formulação comercial de tebuconazole foi mais tóxica do que a de atrazina para girinos de *Physalaemus gracilis*. A CL₅₀ 96h foi de 47,90 mg/L para atrazina e 1,64 mg/L para tebuconazole (Tabela 2).

Tabela 2 - Mortalidade de *Physalaemus gracilis* e concentração letal de atrazina e tebuconazole no teste de exposição aguda. UFFS, Campus Erechim, 2016.

Agrotóxico	Concentração mg/L	Mortalidade					CL ₅₀ mg/L
		24h	48h	72h	96h	Total	
Atrazina	0,0	0	0	0	0	0	47,90 -95%CL: 45,28 +95%CL: 50,51 R ² =0,94 P= 0,00
	19	0	0	0	0	0	
	24	2	1	3	0	6	
	29	2	2	2	0	6	
	37	0	1	0	2	3	
	45	3	2	2	5	12	
	53	4	1	1	6	12	
	60	21	3	0	0	24	
	65	13	13	0	0	26	
	70	9	17	1	1	28	
	75	10	12	2	1	25	
Tebuconazole	0,0	0	0	0	0	0	1,64 -95%CL: 1,42 +95%CL: 1,90 R ² =0,98 p=0,00
	0,5	7	1	1	0	9	
	1,0	2	1	0	1	4	
	1,5	15	3	0	0	18	
	2,0	4	6	1	0	11	
	2,5	26	4	0	0	30	
	3,0	30	0	0	0	30	

A mortalidade dos girinos foi significativamente maior nas dosagens mais altas de ambos os agrotóxicos: atrazina ($F_{(9, 50)}=16,46$; $p<0,01$) e tebuconazole ($F_{(5, 30)}=11,76$; $p<0,01$; Figuras 3 e 4), mostrando diferença entre as concentrações testadas (Tukey = $p<0,05$).

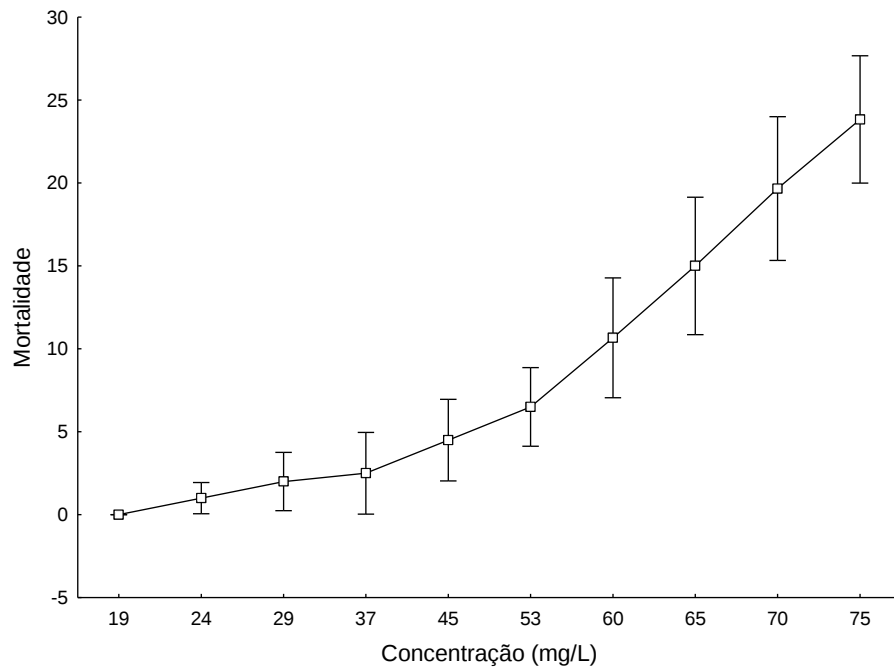


Figura 3 - Mortalidade de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes concentrações (mg/L) de atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

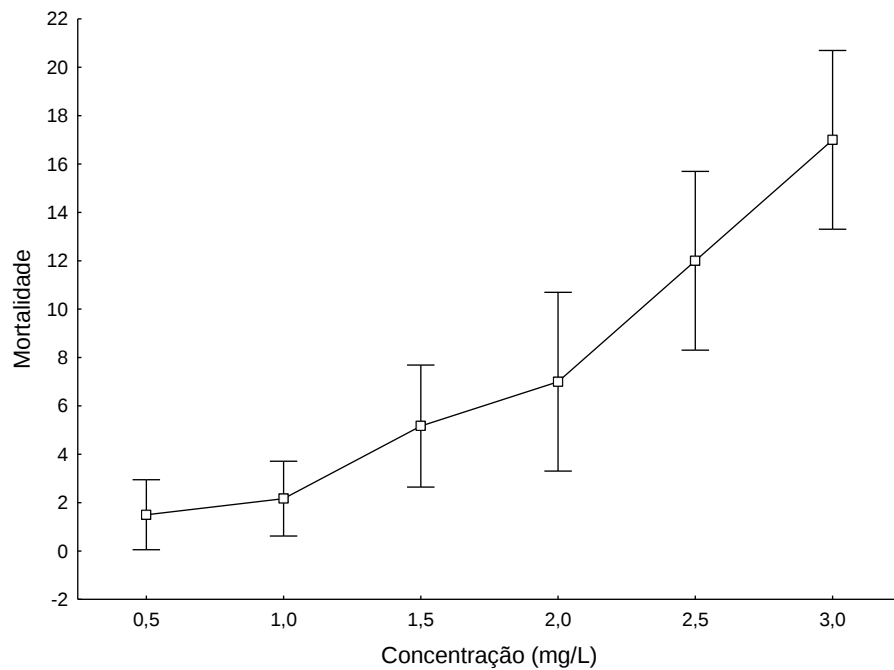


Figura 4 - Mortalidade de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes concentrações (mg/L) de tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

O tempo de exposição foi significativo para o teste de exposição a tebuconazole, ($F_{(3, 20)}=7,21$; $p<0,01$), mas não influenciou em atrazina ($F_{(3, 36)}=2,30$; $p=0,09$; Figuras 5 e 6).

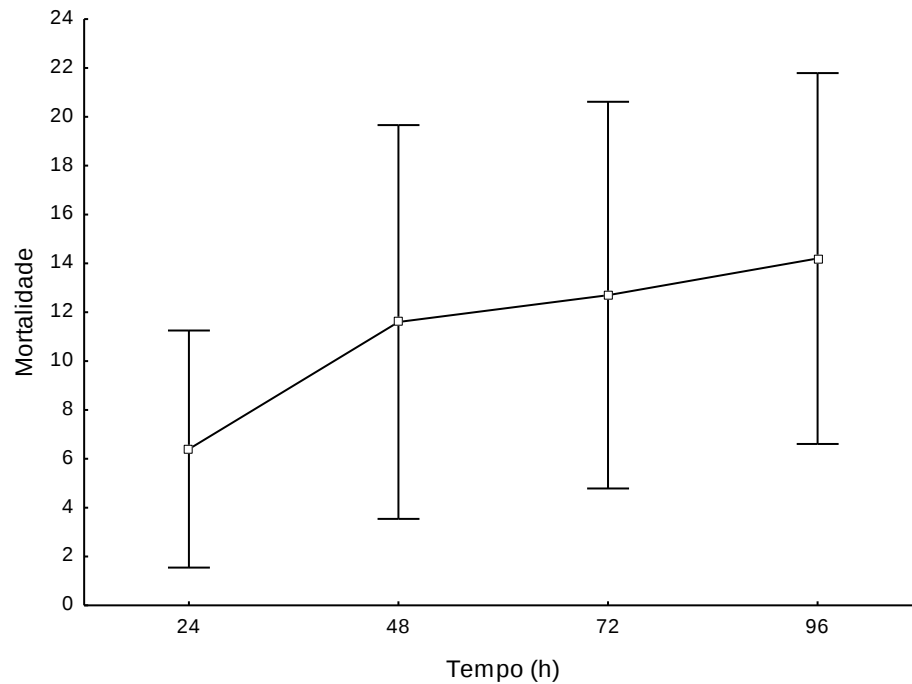


Figura 5 - Mortalidade de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes tempos (h) ao herbicida atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

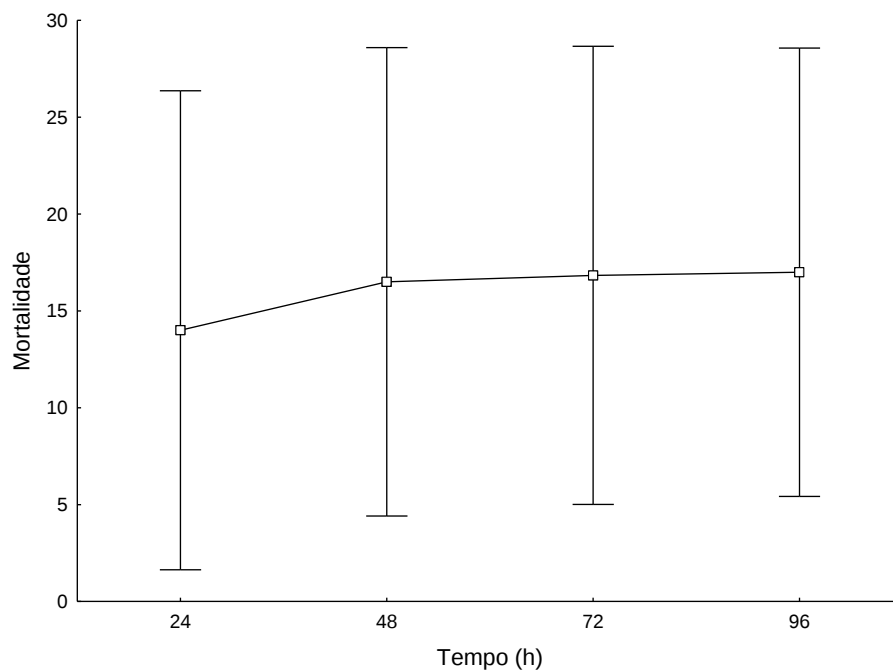


Figura 6 - Mortalidade de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes tempos (h) ao fungicida tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

3.2 Teste crônico

Foram expostos 90 girinos durante 21 dias a cada um dos agrotóxicos testados (tabela 3). Destes, 19 (21,11%) morreram na exposição à atrazina e 16 (17,77%) na exposição à tebuconazole.

Tabela 3 - Mortalidade de *Physalaemus gracilis* no teste de exposição crônica a atrazina e tebuconazole. UFFS, Campus Erechim, 2016.

Agrotóxico	Concentração (mg/L)	Mortalidade			
		7 dias	14 dias	21 dias	Total
Atrazina	0,5	0	1	0	1
	1,0	1	1	4	6
	4,8	4	4	4	12
Tebuconazole	0,01	0	0	7	7
	0,03	0	0	0	0
	0,15	0	0	9	9
Controle	0,0	1	3	4	8

As concentrações não influenciaram na mortalidade dos girinos em ambos os agrotóxicos: atrazina ($F_{(3, 20)}=2,31$; $p=0,1$) e tebuconazole ($F_{(3, 20)}=2,16$; $p=0,12$; Figuras 7 e 8).

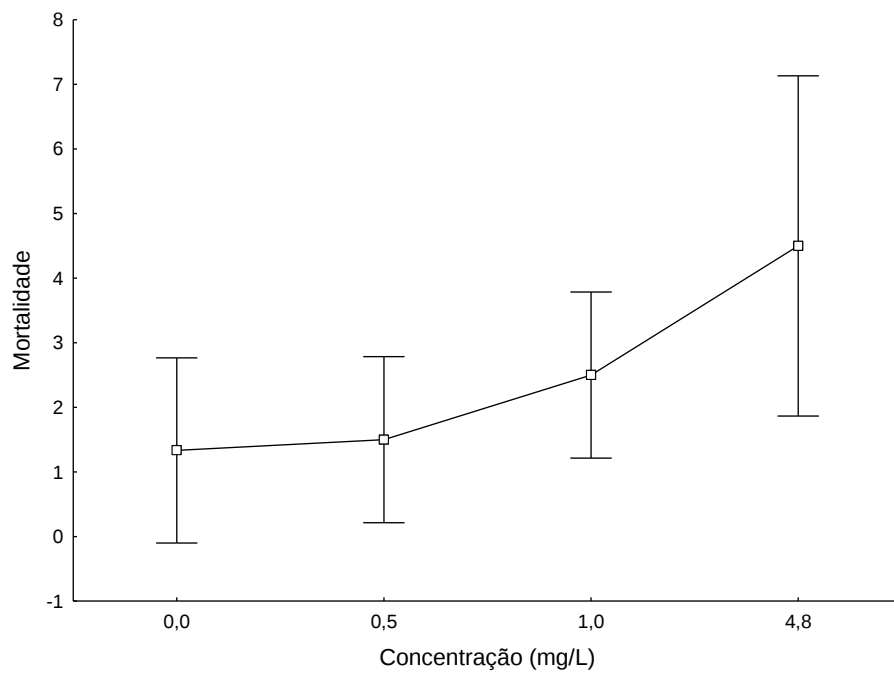


Figura 7 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes concentrações (mg/L) de atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

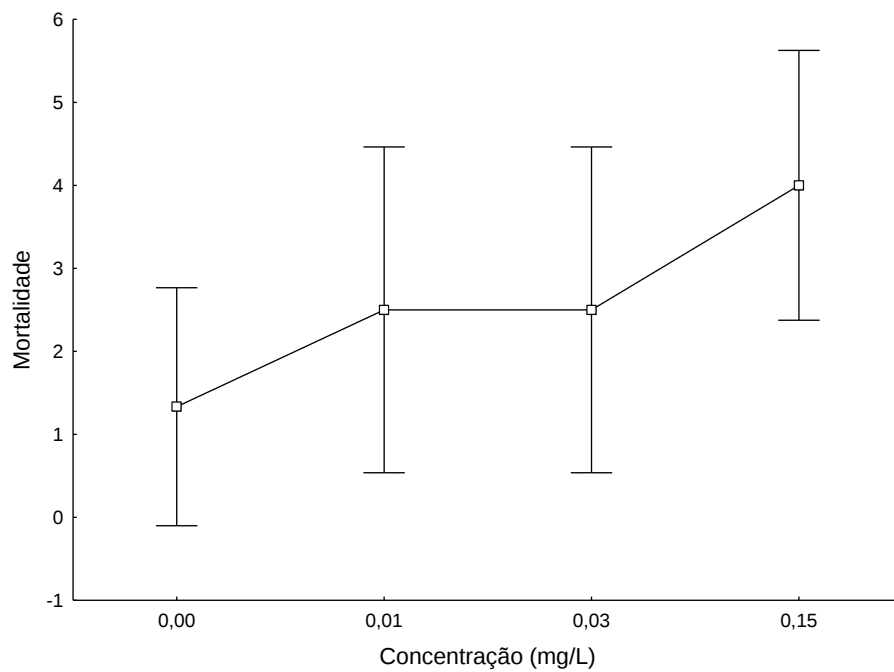


Figura 8 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes concentrações (mg/L) de tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

O tempo de exposição não influenciou na mortalidade para atrazina ($F_{(2,9)}=0,72$; $p=0,5$, mas influenciou no resultado do teste em tebuconazole ($F_{(2,9)}=4,58$; $p=0,04$; Figuras 9 e 10).

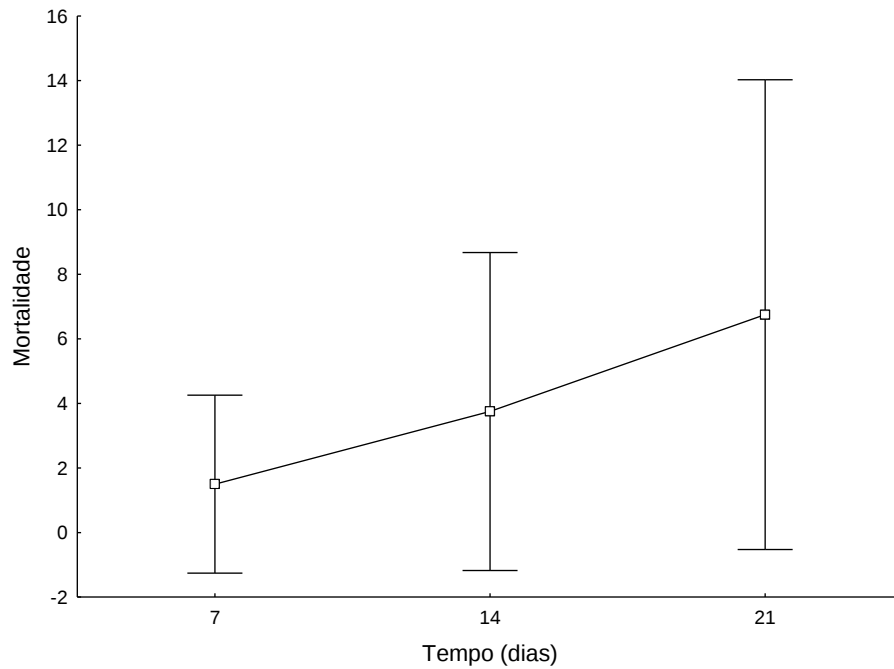


Figura 9 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes tempos (dias) a atrazina. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

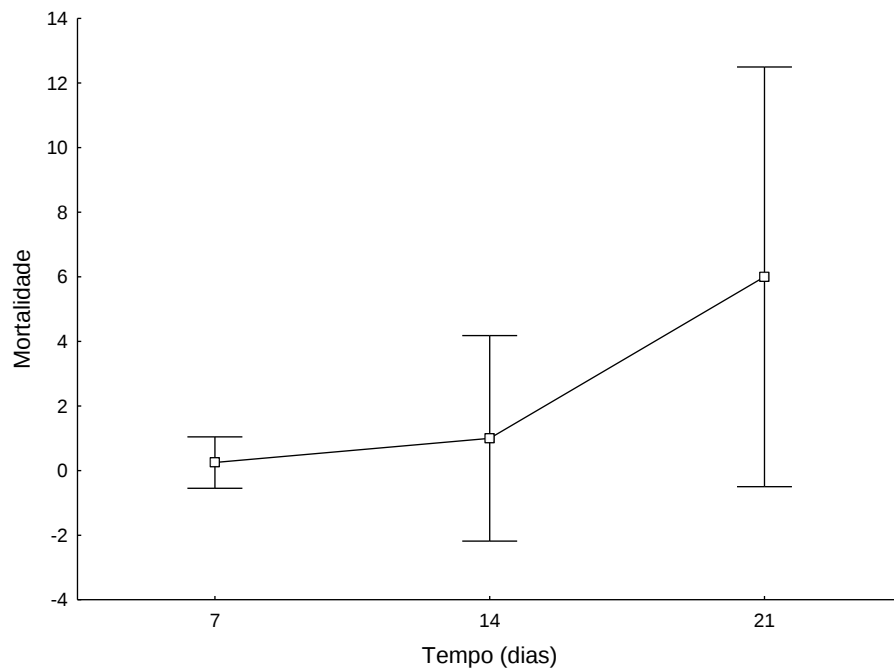


Figura 10 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* exposto a diferentes tempos (dias) a tebuconazole. Quadrados= média; Linhas verticais= Desvio Padrão.

3.2.1 Análise Morfológica

3.2.1.1 Comprimento e massa dos girinos

Os girinos foram colocados nos testes com o comprimento de $9,97 \pm 1,21$ mm ($n = 10$; amplitude = 8,10 - 11,25 mm), e massa de $0,016 \pm 0,009$ g ($n = 10$, amplitude = 0,007 - 0,037 g) (ver dados de comprimento e massa depois da exposição na Tabela 4).

Em 21 dias de teste crônico o comprimento dos girinos aumentou significativamente, comparando com o tamanho de entrada no teste ($F_{(4, 20)}=10,35$; $p<0,01$ para atrazina e $F_{(4, 20)}=7,61$; $p<0,01$ para tebuconazole). Ao final do teste o comprimento não diferenciou em comparação aos grupos expostos e controle ($F_{(3, 16)}=1,53$; $p<0,24$ para atrazina e ($F_{(3, 16)}=0,98$; $p<0,42$ para tebuconazole).

A massa dos girinos não apresentou diferença entre o início e final do teste ($F_{(4, 20)}=0,64$; $p<0,63$ para atrazina e $F_{(4, 20)}=1,30$; $p<0,3$ para tebuconazole) o mesmo ocorreu entre os grupos expostos e controle ($F_{(3, 16)}=0,82$; $p<0,49$ para atrazina e $F_{(3, 16)}=1,26$; $p<0,32$ para tebuconazole).

Tabela 4 – Dados morfológicos dos parâmetros comprimento e massa dos girinos no teste crônico após 21 dias de exposição. UFFS, Campus Erechim, 2016.

Agrotóxico	Parâmetro	Concentração	Média±DP	N	Amplitude
Atrazina	Comprimento	4,8	12,55±0,70	5	11,63 – 13,5
	(mm)	1	13,54±0,67	5	12,63 – 14,47
		0,5	13,21±1,09	5	11,09 – 16,16
	Massa	4,8	0,028±0,018	5	0,01 – 0,057
	(g)	1	0,021±0,011	5	0,005 – 0,03
		0,5	0,016±0,009	5	0,006 – 0,029
Tebuconazole	Comprimento	0,15	13,07±0,67	5	12,14 – 13,9
	(mm)	0,03	13,41±2,05	5	10,93 – 16,11
		0,01	13,61±1,78	5	12,26 – 16,49
	Massa	0,15	0,056±0,052	5	0,017 – 0,144
	(g)	0,03	0,025±0,028	5	0,005 – 0,074
		0,01	0,027±0,021	5	0,006 – 0,05
Controle	Comprimento	0,0	12,14±0,80	5	11,5 – 13,45
	(mm)				
	Massa	0,0	0,02±0,010	5	0,002 – 0,03
	(g)				

3.2.1.2 Alterações morfológicas

O número de alterações morfológicas nos grupos expostos aos agrotóxicos foi significativa em relação ao grupo controle ($F_{(2, 9)}=8,57$; $p<0,01$) para atrazina e ($F_{(2, 9)}= 14,44$; $p<0,01$) para tebuconazole. O número de alterações foi significativo entre as concentrações 0,5 e 1 mg/L de atrazina e entre todas as concentrações para tebuconazole (Tukey, $p<0,05$). Dentre os 71 indivíduos expostos a atrazina que chegaram ao final dos 21 dias de teste, 34 apresentaram alterações morfológicas (47,88%). Sendo 41,2% (14) em 0,5 mg/L; 35,3% (12) em 1,0 mg/L e 23,5% (8) em 4,8 mg/L. Todas as concentrações testadas de forma crônica resultaram em alterações (Tabela 5).

As alterações morfológicas mais frequentes foram má formação na cavidade oral (19; 55,88%) e inchaço no abdômen (14; 41,17%). As alterações na cavidade oral foram evidentes, apresentado deformação ou ausência de mandíbula, ausência de uma ou mais fileiras inteiras de dentículos, fileiras de dentículos tortas, dentículos falhos ou ausentes (figuras 11, 12 e 13). O inchaço se caracterizou pela saliência do intestino. As outras alterações morfológicas foram rompimento intestinal (1; 1,4%), observado na concentração 0,5 mg/L e deformação no corpo (2; 2,8%), observado nas concentrações 4,8 e 1 mg/L (Figuras 7, 8 e 9).

Dentre os 74 indivíduos expostos a tebuconazole que chegaram ao final dos 21 dias de teste, 35 apresentaram alterações morfológicas (47,2%). Sendo 28,6% (10) em 0,01 mg/L; 40% (14) em 0,03 mg/L e 31,4% (11) em 0,15 mg/L. As alterações morfológicas identificadas foram má formação na cavidade oral (18; 51,4%) e inchaço no abdômen (17; 48,57%) (Tabela 5).

Nos indivíduos do controle foram observadas três (13,6%) casos de inchaço no abdômen.

Tabela 5 - Número de alterações morfológicas em *Physalaemus gracilis* para cada concentração de atrazina e tebuconazole em exposição crônica. Um indivíduo pode apresentar mais de um tipo de alteração. UFFS, Campus Erechim, 2016.

Agrotóxico mg/L	Indivíduos analisados	Número de alterações	Tipo de alteração					Edema intestino
			Cavidade oral				Corpo	
			A/DM	AFD	FT	DF		
Atrazina								
0,5	29	14	2	7	-	-	-	5
1	24	12	4	2	2	-	1	5
4,8	18	8	1	2	-	-	1	4
Tebuconazole								
0,01	28	10	-	3	-	1	-	8
0,03	30	14	4	4	-	2	-	7
0,15	21	11	4	4	-	3	-	2
Controle	22	3	-	-	-	-	-	3

A/DM: Ausência ou deformação da mandíbula. **AFD:** Ausência de fileiras de dentículos. **FT:** Fileiras de dentículos tortas. **DF:** Dentículos falhos.

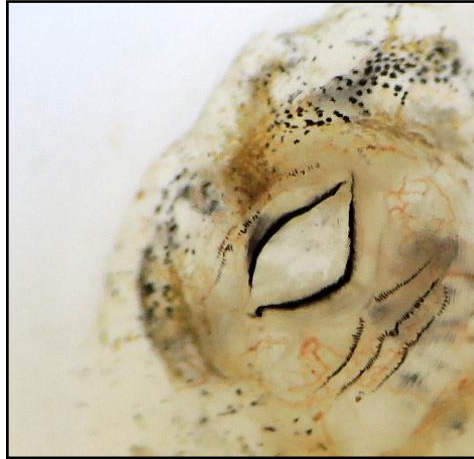


Figura 11 - Girino de *Physalaemus gracilis* do controle, sem alterações morfológicas.

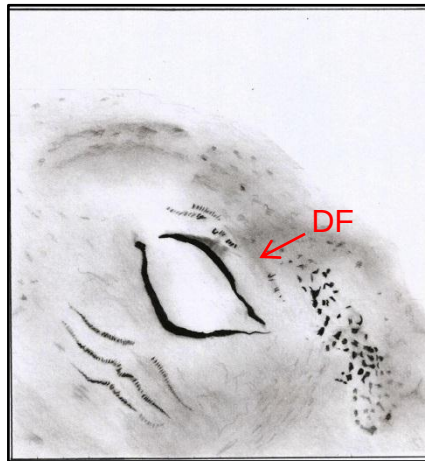


Figura 12 - Girino de *Physalaemus gracilis* com alteração morfológica. Dentículos falhos (DF) na fileira anterior. Fonte: Anderson Brum.

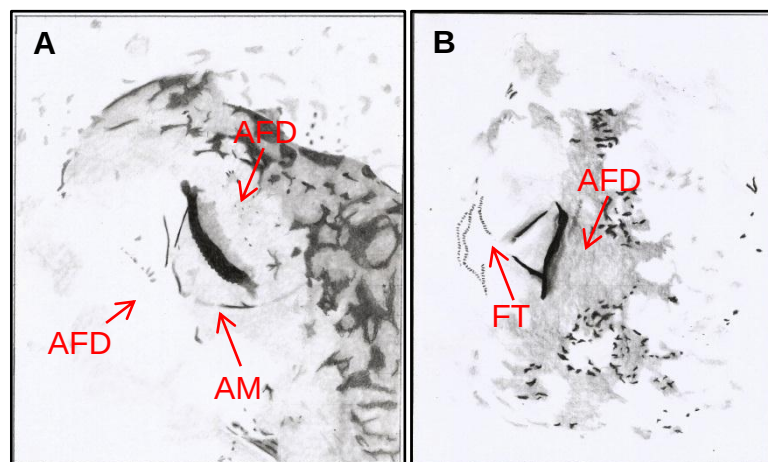


Figura 13 - Girino de *Physalaemus gracilis* com alterações na morfologia oral. A. Ausência de fileiras de dentículos (AFD) na parte anterior e inferior, ausência de mandíbula posterior (AM). B. Ausência de fileiras inteiras de dentículos (AFD) na parte anterior e fileiras de dentículos tortas (FT). Fonte: Anderson Brum.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, atrazina mostrou baixa e tebuconazole média toxicidade de acordo com Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, 2011), onde $CL_{50} < 1 \text{ mg/L}$ indica alta toxicidade; CL_{50} entre 1 e 10 mg/L média toxicidade e CL_{50} maior que 10 mg/L baixa toxicidade.

Para anfíbios resultados semelhantes a este estudo foram relatados para *Bufo americanus* (26,5 mg/L; HOWE et al., 1998) e *Rana pipiens* (47,6 mg/L; HOWE et al., 1998) para atrazina. Apesar da toxicidade aguda parecer alta para o ambiente, as concentrações crônicas ou subletais são as mais encontradas no ambiente de reprodução dos anfíbios. Nos ambiente aquáticos, em geral, as doses registradas para ambos os agrotóxicos são baixas. Dosagens crônicas semelhantes as usadas neste estudo foram encontradas em águas superficiais para atrazina que pode chegar a 2,85 mg/L (USEPA, 2016) e de 0,08 mg/L para tebuconazole (LEFRANCQ et al., 2017). No Brasil de acordo o ministério da saúde o valor máximo permitido na água potável para atrazina é de 0,02 mg/L e para tebuconazole de 0,18 mg/L (BRASIL, PORTARIA 2914/2011). Neste caso, a lei brasileira permite uma concentração de tebuconazole maior do que a testada neste estudo. Dados como estes mostram um cenário de exposição crônica subletal provável para espécies não alvo, como os anfíbios (USEPA, 2016).

A mortalidade dos indivíduos em concentrações crônicas pode ser considerada alta. Apesar destes dados serem apenas em condições laboratoriais, é possível pensar que em um ambiente natural, a morte de 21,11% dos expostos a atrazina e 17,77 % a tebuconazole significaria diminuição da população, e ao longo do tempo, declínio da espécie. *Physalaemus gracilis* pode ser resistente a estes dois agrotóxicos em relação a toxicidade aguda, mas a exposição a longo prazo em doses crônicas subletais causou mortalidade e efeitos na morfologia.

A exposição à atrazina e tebuconazole não produziu diferença no crescimento e massa nos girinos e está de acordo com os resultados encontrados em *Xenopus laevis* (COADY et al., 2005; SCAHILL, 2008) e *Rana pipiens* (ALLRAN & KARASOV, 2000). Apesar de relatos de que atrazina pode causar redução de comprimento e peso em concentrações subletais como encontrados em *Xenopus laevis* (SULLIVAN

& SPENCE, 2003) e *Hyla versicolor* (DIANA et al., 2000). Diferentes resultados refletem as respostas específicas da espécie para cada agrotóxico e o mecanismo de desintoxicação envolvido dependendo da espécie considerada (TONI, 2010).

As alterações morfológicas identificadas em todas as concentrações testadas são sinais típicos de toxicidade e podem ser consideradas malformações. Alterações relacionadas à cavidade oral podem prejudicar a alimentação dos girinos e afetar a sua capacidade de sobrevivência (DAVID et al., 2012). Malformação na boca, além de outras anomalias, foram também encontradas em embriões e girinos de *Rhinella arenarum* expostos a Atrazina (SVARTZ et al., 2012), como também foram constatados em indivíduos expostos ao herbicida glifosato em *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica* (ALMEIDA, 2014) e em girinos de *Scinax nasicus* (LAJMANOVICH et al., 2003).

Outras alterações morfológicas, como a deformação constatada no corpo dos girinos expostos a atrazina caracteriza-se por uma retração nas áreas laterais e também foi encontrada por Iglesias (2015), em *Physalaemus nattereri* expostos ao herbicida glifosato. Malformação no intestino já foi relatado para *Xenopus laevis* exposto a atrazina (LENKOWSKI et al., 2010) e *Physalaemus cuvieri* expostos ao glifosato (ALMEIDA, 2014). Para tebuconazole, pouco foi realizado em relação a malformações em anfíbios. Embriões de *Xenopus laevis*, expostos aos fungicidas triadimefon, cyproconazole e tebuconazole apresentaram desenvolvimento anormal da cabeça e semelhantes alterações nas estruturas orais, como uma redução da maxila e da mandíbula (DI RENZO et al., 2011). Para girinos de *Hyla intermedia* exposto a tebuconazole foi relatado anormalidades na boca além de outras alterações como malformações da cauda e deficiência dos membros (BERNABÒ et al., 2016). Casos de malformações causados por tebuconazole como microcefalia e corpo atrofiado também foram relatados em embriões de *Xenopus tropicalis* (LI et al., 2016). Outro fungicida testado na formulação comercial, Maxim® XL, causou microcefalia e curvaturas axiais em *Rhinella arenarum* (SVARTZ et al., 2016).

Nem todos os girinos expostos às formulações comerciais de atrazina e tebuconazole tiveram alterações morfológicas. No entanto, todas as concentrações crônicas testadas causaram algum tipo de alteração. A sobrevivência foi de 78,8% em atrazina e 82,2% em tebuconazole – e destes que sobreviveram, somente cerca de metade não apresentaram alterações (52,1% em atrazina e 52,7% em tebuconazole).

Os efeitos de atrazina em anfíbios já foram bem documentados. É potencial disruptor endócrino (HAYES et al., 2002, 2003), afeta a metamorfose (FREEMAN & RAYBUM, 2005). Produz alterações na atividade de enzimas antioxidantes como redução de atividade Glutathione S-transferase encontrado em anfíbios de *L. ocellatus* (BRODEUR et al., 2011) e também é responsável pela produção de danos oxidativos as células causada pelo aumento de espécies reativas, as quais induzem danos em várias macromoléculas, incluindo lipídeos e proteínas (FALFUSHINSKA et al., 2008; SNYDER et al., 2017). Além disso, produz anomalias gonodais (HAYES, 2002) como as encontradas em *Rana clamitans* (COADY et al., 2004) e *Xenopus laevis* (CARR et al., 2003; TAVERA-MENDOZA et al., 2002), que pode prejudicar a reprodução em anfíbios. Outros tipos de alterações morfológicas foram causadas pela atrazina, como edemas e deformações na cauda (ALLRAN & KARASOV, 2001), falta de pigmentação e curvatura na coluna (SCAHILL, 2008) e malformações dos membros (BRODEUR et al., 2011).

O problema disso é que esse herbicida é amplamente utilizado (SOLOMON et al., 1996; ANDRUS et al., 2013; SNYDER et al., 2017) e apesar de ser um herbicida relativamente móvel e não se bioacumular de forma apreciável, o mesmo é persistente na água e está sujeito a degradação biológica (SOLOMON et al., 1996). As concentrações de resíduos nos ecossistemas aquáticos são maiores após as aplicações em áreas agrícolas (SOLOMON et al., 1996) e podem estar dentro das faixas testadas em laboratório. Além disso, os anfíbios desenvolvem-se nesses locais que podem receber e concentrar atrazina (KNUTSON et al., 2004).

Ao contrário de atrazina, pouco se sabe sobre a toxicidade aguda e crônica de tebuconazole em anfíbios (POULSEN et al., 2015; BERNABÒ et al., 2016; LI et al., 2016), apesar de ser um fungicida amplamente utilizado e encontrado no ambiente (SMALLING et al., 2015). A falta de estudos sobre o efeito deste fungicida, deixa dúvidas sobre como espécies não alvo, como anfíbios, sobrevivem em ambientes contaminados.

Mortalidade e alterações morfológicas foram os fatores analisados neste estudo pela exposição à formulação comercial de atrazina e tebuconazole. A mortalidade causa diminuição nas populações e alterações morfológicas são malformações que podem levar a dificuldade na alimentação e fuga de predadores (SVARTZ et al., 2012). *Physalaemus gracilis*, assim como muitos anfíbios, vive em ambientes que tem dessecação rápida, e necessitam estar em condições

adequadas para a metamorfose para a vida adulta. Esses ambientes lóticos também podem concentrar mais agrotóxicos, e neste caso, anfíbios podem estar mais sujeitos aos efeitos crônicos de exposição (BLAUSTEIN et al., 2003).

5 CONCLUSÃO

As formulações comerciais de atrazina e tebuconazole foram tóxicas para girinos de *Physalaemus gracilis* e a mortalidade foi significativamente maior nas dosagens mais altas de ambos os agrotóxicos. A exposição a doses crônicas foram suficientes para causar alterações morfológicas em todas as concentrações testadas principalmente na cavidade oral em *Physalaemus gracilis* e podem ser prejudiciais a sobrevivência da espécie. Sugerimos que o uso dos agrotóxicos nas proximidades de habitats de anfíbios deva ser mais estudado, uma vez que o declínio de espécies de anfíbios pode ter impacto significativo nos ecossistemas naturais, pela fundamental importância dessas populações na dinâmica trófica e manutenção do ecossistema.

6 REFERÊNCIAS

ACHAVAL, F.; OLMOS, A. **Anfibios y reptiles del Uruguay**. 2 ed. Graphis: Montevideo, 2003. 136 p.

ACKERMAN, F.; WHITED, M.; KNIGHT, P. Would banning atrazine benefit farmers? **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 20, p. 61-70, 2014.

ADAPAR. **Bula Riza 200EC Comerc.** 2014. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/riza_200_ec.pdf>. Acesso em: 26 nov 2015.

ADAPAR. **Bula Siptran.** 2016. Disponível em: <www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/siptran.pdf>. Acesso em: 13 dez 2015.

ALMEIDA, P.R. 2014. 96f. **Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup Original® em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae)**. Dissertação (Mestrado Ciência e Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas/MG. 2014.

ALLRAN, J.W., KARASOV, W.H. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 2850-2855, 2000.

ALLRAN, J.W., KARASOV, W.H. Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 769-775, 2001.

ANDRUS, J.M.; WINTER, D.; SCANLAN, M.; SULLIVAN, S.; BOLLMAN, W., WAGGONER, J.B.; HOSMER, A.J.; BRAIN, R.A. Seasonal synchronicity of algal assemblages in three Midwestern agricultural streams having varying concentrations of atrazine, nutrients, and sediment. **Science of the Total Environment**, v. 458, 125-139, 2013.

ARAÚJO, M.C.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, L.C.; MACHADO, D.C.; SILVA, K.C.C.; LIMA, A.V.A.; JUNIOR, L.B.C.; BEZERRA, R.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 182-189, 2016.

BERNABÒ, I.; GUARDIA, A.; MACIRELLA, R.; SESTI, S.; CRESCENTE, A.; BRUNELLI, E. (2015). Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 56-66, 2016.

BLAUSTEIN, A.R.; KIESECKER, J.M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v. 5, p. 597-608, 2002.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M.; HATCH, A.C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity Distribution**, v.9, p.123-140, 2003.

BETANCOURT, M.; RESENDIZ, A.; CASAS, E.; FIERRO R. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 508-512, 2006.

BOONE, M.D.; SEMLITSCH, R.D. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. **Ecological Applications**, v. 12, p. 307-316, 2002.

BRASIL. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 20 fev. 2017.

BRIDGES, C.M. Predator-prey interactions between two amphibian species: Effects of insecticide exposure. **Aquatic Ecology**, v. 33, p. 205-211, 1999.

BRISTON, C.A. Abundance, metamorphosis, development and behavioural abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three agrichemicals and methyl mercury in outdoor mesocosmos. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, p. 154-161, 1998.

BRODEUR, J.C.; CANDIOTI, J.V.; SOLONESKI, S. LARRAMENDY, M.L.; RONCO, A.E. Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an Agroecosystem Experiencing Severe Drought. **Journal of Herpetology**, v. 46, p. 72-78, 2012.

BRÜHL, C.A.; SCHMIDT, T.; PIEPER, S.; ALSCHER, A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? **Scientific Reports**, v. 3, n. 1135, 2013.

BRUNELLI, E.; BERNABÒ, I.; BERG, C.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; BONACCI, A.; TRIPEPI, S. (2008). Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 135-142, 2009.

CARR, J.A.; GENTLES, A.; SMITH, E.E.; GOLEMAN, W.L.; URQUIDI, L.J.; THUETT, K.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P.; GROSS, T.S.; SOLOMON, K.R.; KRAAK, G.V.D. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 396-405, 2003.

CASTRO, V.L.L.S. Uso de misturas de agrotóxicos na agricultura e suas implicações toxicológicas na saúde. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, p. 87-94, 2009.

COADY, K.K.; MURPHY, M.B.; VILLENEUVE, D.L.; HECKER, M.; JONES, P.D.; CARR, J.A.; SOLOMON, K.R.; SMITH, E.E.; KRAAK, G.V.D.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 67, p. 941-957, 2004.

COADY, K.K.; MURPHY, M.B.; VILLENEUVE, D.L.; HECKER, M.; JONES, P.D.; CARR, J.A.; SOLOMON, K.R.; SMITH, E.E.; KRAAK, G.V.D.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 160-173, 2005.

DAVID, M.; MARIGOUDAR, S.R.; PATIL, V.K.; HALAPPA, R. (2011). Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 127-134, 2012.

DE GERÓNIMO, E., APARICIO, V.C., BARBARO, S., PORTOCARRERO, R., JAIME, S., COSTA, J.L. (2013). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. **Chemosphere**, v. 107, p. 423-431, 2014.

DIANA, S.G., RESETARITS, W.J., JR., SCHAEFFER, D.J., BECKMAN, K.B., AND BEASLEY, V.R. (1999). Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 2961-2967, 2000.

DI RENZO, F.; BACCHETTA, R.; BIZZO, A.; GIAVINI, E.; MENEGOLA, E. Is the amphibian *X. laevis* WEC a good alternative method to rodent WEC teratogenicity assay? The example of the three triazole derivative fungicides Triadimefon, Tebuconazole, Cyproconazole. **Reproductive Toxicology**, v. 32, p. 220-226, 2011.

EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl. **Biological Report**, v. 85, p. 1-55, 1989.

EZEMONYE, L., TONGO, I. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 29-36, 2009.

EXTOXNET. **Atrazine information profiles**. Extension Toxicology Network Infobase. Disponível: <<http://ace.orst.edu/info/extoxnet>>. Oregon State University. 1996.

FALFUSHINSKA, H.; ROMANCHUK, L.D.; STOLYAR, O.B. Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, Part C, p. 223-229, 2008.

FREEMAN, J.L.; RAYBURN, A.L. Developmental impact of atrazine on metamorphosing *Xenopus laevis* as revealed by nuclear analysis and morphology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 1648-1653, 2005.

GHS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals**. Fourth Edition. United Nations, New York and Geneva, 2011. p. 561.

GODOY, C.V.; PIMENTA, C.B.; MIGUELWRUCK, et al. **Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/07: Resultados sumarizados dos ensaios em rede**. Circular técnica da Embrapa. Londrina, PR. 2007.

GOSNER, K.L. A Simplified table for starting anuran embryos and larvae, with notes on identification. **Herpetology**, v. 16, p. 183-190, 1960.

HADDAD, C.F.B. **Uma análise da lista brasileira de anfíbios**. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Ed.). Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 287-320.

HAYES, T.B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A.A.; VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v. 99, p. 5476-5480, 2002.

HAYES, T.B., HASTON, K., TSUI, M., HOANG, A., HAEFFELE, C., AND VONK, A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipens*): Laboratory and field evidence. **Environmental Health Perspectives**, v. 11, p. 568–575, 2003.

HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; ANDRADES, M.S.; ÁLVAREZ-MARTÍN, A.; POSE-JUAN, E.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.S.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.J. (2012). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. **Journal of Hydrology**, v. 486, p. 234–245, 2013.

HINFRAY, N.; PORCHER, J.; BRION, F. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 144, p. 252-262, 2006.

HOWE, G.E.; GILLIS, R.; MOWBRAY, R.C. (1996). Effects of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 519–525, 1998.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2014. Boletins anuais de Produção, Importação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina3>. Acesso em: 23 nov 2016.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Disponível em: <www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina2>. Acesso em: 8 jun 2016.

IGLESIAS, J.M.P. **Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto. 2015.

INSTITUTO RÃ BUGIO. *Physalaemus gracilis*. Disponível em: <http://www.ra-bugio.org.br/ver_especie.php?id=182>. Acesso em: 24 ago 2016.

IUCN - **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species**. Version 2009. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 12 out. 2015.

KINNBERG, K.; HOLBECH, H.; PETERSEN, G.; BJERREGAARD, P. Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 145, p.165-170. 2007.

KJARSTAD, M.B., TAXVIG, C., NELLEMAN, C., VINGGAARD, A.M., ANDERSEN, H.R. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reproductive Toxicology**, v. 30, p. 573-582, 2010.

KNUTSON, M.G.; RICHARDSON, W.B.; REINEKE, D.M.; GRAY, B.R.; PARMELEE, J.R.; WEICK, S.E. 2004. Agricultural ponds support amphibian populations. *Ecological Applications*, v. 14, p. 669-684, 2004.

LANGONE, J.A. **Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos)**. Museo Damaso Antonio Larrañaga. Serie de Divulgación, v. 5, p. 1-123, 1994.

LAJMANOVICH, R.C.; SANDOVAL, M.T.; PELTZER, P.M. (2002). Induction of Mortality and Malformation in *Scinax nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. **Environmental Contamination Toxicology**, v. 70, p. 612–618, 2003.

LEFRANCQ, M.; JADAS-HÉCART, A.; LA JEUNESSE, I.; LANDRY, D.; PAYRAUDEAU, S. High frequency monitoring of pesticides in runoff water to improve understanding of their transport and environmental impacts. **Science of the Total Environment**, v. 587-588, p. 75-86, 2017.

LENKOWSKI, J.R.; SANCHEZ-BRAVO, G.; MCLAUGHLIN, K.A. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 1305-1308, 2010.

LI, D.; LIU, M.; YANG, Y.; SHI, H.; ZHOU, J.; HE, D. (2015). Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides. **Environmental Pollution**, v. 208, p. 868-874, 2016.

LIU, N.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; ZHENG, Y. 2015. Chiral bioaccumulation behavior of tebuconazole in the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 78-84, 2016.

MENNILLO, E.; CASU, V.; FEDERICA TARDELLI, F.; MARCHI, DE L.; FREITAS, R., PRETTI, C. (2016). Suitability of cholinesterase of polychaete *Diopatra neapolitana* as biomarker of exposure to pesticides: In vitro characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 191, p. 152-159, 2017.

NWANI, C.D.; LAKRA W.S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, p. 3298–3312, 2010.

POULSEN, R.; LUONG, X.; HANSEN, M.; STYRISHAVE, B.; HAYES, V. Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 168, p. 28-37, 2015.

RELYEA, R.A., (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, p. 618–627, 2006.

ROBERGE, M.; HAKK, H.; LARSEN, G. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. **Toxicology Letters**, v. 154, p. 61-68, 2004.

SANDERSON, J. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. **Toxicological Sciences**, v. 94, p. 3-21, 2006.

SCAHILL, J.L. Effects of atrazine on embryonic development of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and *Xenopus laevis*. **Bios**, v. 79, p. 139-149, 2008.

SMALLING, K.L.; REEVES, R.; MUTHS, E.; VANDEVER, M.; BATTAGLIN, W.A.; HLADIK, M.L.; PIERCE, C.L. Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. **Science of the Total Environment**, v. 502, p. 80-90, 2015.

SNYDER, M.N.; HENDERSON, W.M.; GLINSKI, D.A.; PURUCKER, S.T. Biomarkers analysis of American toad (*Anaxyrus americanus*) and grey tree frog (*Hyla versicolor*) tadpoles following exposure to atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 184-193, 2017.

SOLOMON, K.R.; BAKER, D.B.; RICHARDS, R.P.; DIXON, K.R.; KLAINE, S.J.; LA POINT, T.W.; KENDALL, R.J.; WEISSKOPF, C.P.; GIDDINGS, J.M.; GIESY, J.P.; HALL, L.W.; WILLIAMS, W.M. Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 31-76, 1996.

SULLIVAN, K., SPENCE, K. (2002). Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 627-635, 2003.

SVARTZ, G.; HERKOVITS, J.; PÉREZ COLL, C.S. Sublethal effects of atrazine oembryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1251-1259, 2012.

SVARTZ, G.; MEIJIDE, F.; PÉREZ COLL, C.S. (2015). Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development,metamorphosis, and gonadogenesis of the South American toad *Rhinella arenarum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 1-7, 2016.

TAVERA-MENDOZA, I.; RUBY, S.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; CYR, D.; MARCOGLIES, D. Response of the amphibian tadpole *xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 1264-1267, 2002.

TAXVIG, C., HASS, U., AXELSTAD, M., DALGAARD, M., BOBERG, J., ANDEASEN, H.R.,VINGGAARD, A.M. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, v. 100, p. 464-473, 2007.

TONI, C.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; CLASEN, B.E.; CATTANEO, R.; SANTI, A.; PRETTO, A.; ZANELLA, R.; LEITEMPERGER, J. (2009). Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 590-595, 2010.

WRUBLEWSKI, J. **Toxicidade aguda e crônica de agrotóxicos em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Fronteira Sul. Erechim-RS. 2016.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY WASHINGTON (EPA). 2000. **Tebuconazole**. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-28997_29-Feb-00_a.pdf>. Acesso em: ago 2016.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Refined Ecological Risk Assessment for Atrazine. **Environmental Fate and Effects Division, Of Pesticide Programs**, v. 12, 2016.

VERDADE, V.K.; DIXO, M.; CURCIO, F.F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 161-172, 2010.

3.2 CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis* EXPOSTOS Á ATRAZINA E TEBUCONAZOLE

Resumo

Os agrotóxicos, representados por substâncias químicas tem objetivo de controlar as pragas agrícolas. Entretanto podem ser prejudiciais aos sistemas biológicos de diversos organismos aquáticos. Neste sentido é importante avaliar esses efeitos através de biomarcadores que fornecem informações sobre a resposta a contaminantes em um organismo. Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos do herbicida atrazina e do fungicida tebuconazole sobre o perfil antioxidante e possível dano oxidativo em girinos de *Physalaemus gracilis*. Foram realizados testes de toxicidade crônica nas seguintes concentrações: atrazina (4,8, 1 e 0,5 mg/L) e tebuconazole (0,15, 0,03 e 0,01 mg/L). Foram utilizados cinco girinos, mantidos em um recipiente de vidro de 500 mL, em seis réplicas para cada tratamento de atrazina e tebuconazole e seis réplicas para o controle, durante 21 dias. O “n” amostral foi de seis sendo utilizado pool de cinco girinos em cada réplica. Ao final dos 21 dias de exposição os girinos foram eutanasiados e mantidos sob congelamento em nitrogênio líquido, após cada pool de cinco girinos foram homogeneizados com tampão Tris-HCl [50mM] pH 7,5. Este homogenato foi utilizado para todas as análises. Foram medidos: Enzima Acetilcolinesterase (AChE); Glutathione S-transferase (GST); Superóxido dismutase (SOD); Proteína carbonil; Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e Tióis não protéicos (NPSH). Os girinos expostos a atrazina e tebuconazole apresentaram inibição significativa da atividade da AChE, aumento de atividade da GST e SOD. Também ocorreu aumento nos níveis de proteína carbonil e TBARS. Não foram observadas alterações em níveis de NPSH. A exposição aos agrotóxicos testados desencadeou uma resposta antioxidante representada pelo aumento da atividade das enzimas GST e SOD. O dano oxidativo foi observado pelo aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em girinos de *Physalaemus gracilis*.

Palavras-chaves: Biomarcadores. Parâmetros enzimáticos. Dano oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos poderá futuramente resultar na conversão de ecossistemas naturais em áreas agrícolas, o que representaria aumento no uso de agrotóxicos ao redor do mundo (BRODEUR et al., 2011). Os diferentes agroquímicos, e ou agrotóxicos de diferentes classes e composição química ao atingir recursos hídricos podem prejudicar espécies aquáticas bastante sensíveis à contaminação do ambiente. Com isso, existe a necessidade de compreender e avaliar os efeitos biológicos dessas substâncias através do estudo de biomarcadores em diferentes espécies que habitam ambientes aquáticos, incluindo anfíbios (ALPUCHE-GUAL & GOLD-BOUCHOT, 2008; SNYDER et al., 2017).

Os biomarcadores são definidos como alterações suborgânicas, que ocorrem em níveis celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, que podem ser mensuradas em células, fluídos corporais, tecidos e órgãos dentro do organismo e que podem ser indicativo de exposição ou efeito de um contaminante (VAN DER OOST, 2003; LAM, 2009). Os biomarcadores bioquímicos são considerados ferramentas simples de resposta a contaminantes e fornecem informações rápidas e precoces da presença de contaminantes no ambiente (AMORIM, 2003).

Os poluentes ambientais, podem provocar um aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), com redução de defesas antioxidantes em organismos aquáticos, ocasionando assim, uma situação de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um processo fisiopatológico, que ocorre em situações em que há um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua detoxificação pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes nos organismos (AHMAD et al., 2000; FERREIRA et al., 2010). As EROs são radicais livres ou moléculas reativas instáveis formadas durante os processos de oxidações biológicas que ocorrem nos diferentes organismos vivos no funcionamento normal das células. Entretanto, seu excesso pode ser prejudicial, podendo causar danos oxidativos às macromoléculas, peroxidação de lipídios da membrana e prejuízos ao funcionamento da atividade das enzimas, podendo causar também oxidação de proteínas (FALFUSHINSKA et al., 2008; CLASEN et al., 2012).

Para a defesa contra os danos oxidativos, o organismo animal possui mecanismos antioxidantes, que podem ser: enzimáticas ou mecanismos de proteção não enzimáticos. Dentre as principais enzimas antioxidantes estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (NOCTOR & FOYER, 1998; ALMEIDA et al., 2007; OSSANA et al., 2013). A SOD é uma das principais enzimas antioxidantes responsável pela primeira linha de defesa da célula contra EROs, atuando na catalisação da reação de O_2^- em O_2 e H_2O_2 . Pelo mecanismo de reação que se inicia com a redução da enzima pelo superóxido, resultando na formação de oxigênio (SHARMA et al., 2012). A enzima glutathione S-transferase (GST), uma enzima de biotransformação, catalisa a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas, e possuem um papel fundamental em mecanismos de desintoxicação intracelular de compostos químicos, como herbicidas e fungicidas (CHELVANAYAGAM et al., 2001; FAROMBI et al., 2007; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Para avaliar possíveis danos ao sistema nervoso, a avaliação da atividade da enzima Acetilcolinesterase é de grande importância. A inibição dessa enzima pode afetar a locomoção e o equilíbrio em organismos expostos a pesticidas e pode impedir a alimentação, os reflexos e o comportamento reprodutivo (MIRON et al., 2005). A inibição da acetilcolinesterase afeta animais devido ao papel central desta enzima para regular os níveis de acetilcolina neurotransmissor do sistema nervoso central, e junção neuromuscular nas sinapses simpáticas (SANCHO et al., 2000). Para peixes a inibição da acetilcolinesterase pode ser perigosa, principalmente por atingir a atividade natatória, comprometendo a alimentação e a fuga de seus predadores (BÁLINT et al., 1995). Neste sentido, torna-se importante analisar os efeitos de agroquímicos sobre a atividade da enzima AChE em outros organismos aquáticos, em específico os anfíbios.

Além das enzimas antioxidantes que o organismo apresenta para neutralizar as EROs, existem antioxidantes não-enzimáticos que auxiliam na defesa contra radicais livres, que podem responder à contaminação ambiental com variações nas suas concentrações (VAN DER OOST et al., 2003), entre eles podemos citar: grupamentos tióis não-proteicos (SH não ligados a proteínas). A GSH (glutathione reduzida) formada pela união dos aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina. Este tripeptídeo é o grupamento não-proteico mais abundante presente nas células animais (OROPESA et al., 2009). A GSH está envolvida em numerosos processos

que são essenciais para as funções biológicas normais, como a síntese de DNA e proteínas. Desse modo a sua oxidação pode diminuir a síntese proteica (MENEZES et al., 2016). Também ajuda as células em seu processo de detoxificação, protegendo as células através da conjugação com substâncias tóxicas, resultando em um intermediário menos tóxico, que pode ser excretado, reduzindo as injúrias nas células (MARAN et al., 2009).

Quando as defesas enzimáticas e não enzimáticas não são suficientes para neutralizar a formação de EROs proveniente da metabolização de produtos endógenos e exógenos, causa ao organismo o estresse oxidativo. O dano oxidativo causado afeta o funcionamento da célula, podendo afetar proteínas, causar inativação de enzimas, peroxidação lipídica e danos ao DNA (VALKO et al., 2006; MONTEIRO et al., 2006). Como marcadores de estresse oxidativo podem ser utilizados análises dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativo de peroxidação lipídica, bem como a dosagem do conteúdo de proteína carbonil (MENEZES et al., 2016).

A peroxidação lipídica ocorre quando os radicais livres atacam o ácido graxo insaturado, causando danos na membrana celular, afetando sua estrutura e função (TONI et al., 2011). Também pode ocorrer a formação de proteína carbonil. Os EROs conduzem a mudança da estrutura e função das proteínas em uma situação de estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005; SHAO et al., 2012).

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de investigar alterações bioquímicas provocadas em peixes expostos a pesticidas (MODESTO & MARTINEZ, 2010; FERREIRA et al., 2010; TONI et al., 2010, MENEZES et al., 2016a). No entanto, ainda são escassos os trabalhos que abordam essas alterações em anfíbios anuros (ATTADEMO et al., 2011; DAVID et al., 2012; GRIPP et al., 2017;), especificamente a toxicidade do herbicida atrazina e o fungicida tebuconazole em *Physalaemus gracilis*. O conhecimento das respostas bioquímicas nesta espécie pode servir como ferramenta, podendo no futuro ser empregada em programas para avaliação de risco ambiental.

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do herbicida atrazina e do fungicida tebuconazole sobre o perfil antioxidante, medindo-se as enzimas: acetilcolinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), e superóxido dismutase (SOD), e os níveis de tióis não proteicos (NPSH) como antioxidante não enzimático. Investigar possível dano oxidativo, medindo-se níveis de TBARS (substâncias

reativas ao ácido tiobarbitúrico) e de proteína carbonil em girinos de *Physalaemus gracilis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agrotóxicos

Foram realizados testes de toxicidade aquática utilizando os agrotóxicos, atrazina, herbicida produto comercial Atrazina Siptran® SC 500 g/L e tebuconazole, fungicida produto comercial Rival 200 EC 200 g/L.

2.2 Espécie teste

Foi selecionada a espécie *Physalaemus gracilis*, uma espécie de anfíbios da família Leptodactylidae, conhecida popularmente por rã-chorona, com distribuição geográfica no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (LANGONE, 1994; Figura 1).

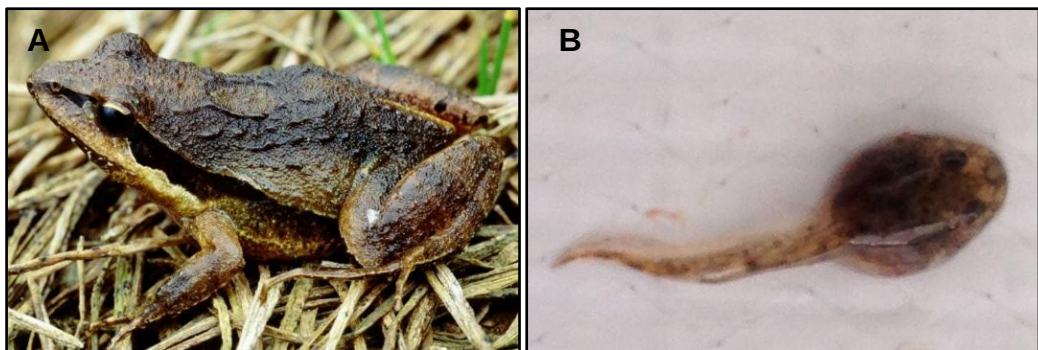


Figura 1 – A. Indivíduo adulto de *Physalaemus gracilis*. Fonte: www.ra-bugio.org.br
B. Girino de *Physalaemus gracilis*.

2.3 Teste Toxicológico

Foram realizados testes de toxidade crônica para atrazina e tebuconazole, nas concentrações 4,8, 1 e 0,5 mg/L para atrazina e 0,15, 0,03 e 0,01 mg/L para

tebuconazole. Foram utilizados cinco girinos, mantidos em um recipiente de vidro de 500 mL, preparadas seis réplicas para cada tratamento de atrazina e tebuconazole e seis réplicas para o controle, durante 21 dias. Os girinos foram alimentados uma vez ao dia durante o teste, usando ração farelada, com no mínimo 40% de proteína bruta. Utilizou-se para os testes água de poço artesiano. A água mantida na temperatura de 23°C (± 1 °C) e oxigênio dissolvido 5,0 ($\pm 1,0$ mg/L). No laboratório usou-se ar condicionado quente/frio mantida a temperatura entre 23 e 25 °C.

2.4 Análises Bioquímicas

Ao final do teste crônico os girinos foram eutanasiados e mantidos sob congelamento em nitrogênio líquido e enviados ao Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTaq) da Universidade Federal de Santa Maria para análises bioquímicas. Foram medidos: Enzima Acetilcolisterase (AChE); Glutathione S-transferase (GST); Superóxido dismutase (SOD); Proteína carbonil; TBARS e Tióis não protéicos (NPSH).

Os girinos foram homogeneizados inteiros (50 mg) com tampão de Tris-HCl [50mM] a pH 7,5 e centrifugado a 3000 rpm durante 10 min. Este homogenado foi utilizado para todas as análises seguintes. Todas as medidas foram feitas em duplicata.

2.4.1 Atividade AChE

A atividade AChE foi medida utilizando o método descrito por Ellman et al. (1961) com algumas modificações. As alíquotas de sobrenadante (0,1 mL) foram incubadas a 30°C durante 2 min com uma solução contendo tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 e 1 mM de DTNB. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de ASCH (0,5 mM). O volume final foi de 2,0 mL. A absorbância foi medida por espectrofotometria (espectrofotômetro Femto Scan) a 412 nm,

durante 2 min. A atividade da enzima foi expressa em μmol de ASCH hidrolisado/min/mg de proteína.

2.4.2 Atividade GST

A atividade foi determinada nos girinos por uma modificação do procedimento descrito por Habig et al. (1974). Esta análise foi realizada no espectrofotômetro de microplacas. A mistura de ensaio consistiu em 10 μL de homogenato, 150 μL de tampão de fosfato de potássio (TFK) [20 mM] a pH 6,5 (mantida a 37 ° C em um banho de água), 50 μL de glutathione reduzida (GSH) e 50 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A absorbância foi determinada em modo cinético a 340 nm durante 2 minutos. A atividade de GST foi determinada utilizando o coeficiente de extinção de 9,6 mM/cm e expressa em μmol de GS-DNB/min/mg de proteína.

2.4.3 Atividade SOD

Atividade de SOD foi realizada em girinos por modificação de Misra & Fridovich (1972). Este método foi baseado na inibição da reação de radical superóxido com adrenalina. A SOD presente na amostra compete com o sistema de detecção para o radical superóxido. A oxidação de adrenalina conduz à formação do produto colorido, adrenocromo, que é detectado utilizando um espectrofotômetro. Volumes distintos de homogeneizado (5, 10, 15 e 20 μL) foram pipetados para microplacas e 190, 185, 180 e 175 μL de NaOH glicina-[50 mM] pH 10,6 (mantida a 37°C em banho de água), respectivamente, e 5 μL da adrenalina [60 mM]. A absorbância foi lida em modo de cinética a 480 nm durante 10 minutos. A atividade da SOD foi expresso em UI SOD proteína/mg. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a oxidação da adrenalina em 50%.

2.4.4 Níveis de NPSH

Níveis de NPSH foram determinados nos girinos por uma modificação do método de Ellman (1959). 100 µL do homogeneizado foi misturado com 100 µL de ácido tricloroacético a 10% (TCA), seguido por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min. O homogenado desproteinizado, foi pipetado na proporção de 30 µl para microplaca, 70 µL de água destilada, 100 µL de tampão de fosfato de potássio (TFK) [50 mM] pH 7,0, e 10 µl de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) [10 milímetros]. A microplaca foi incubada no escuro durante 20 minutos. A absorbância foi lida em 412 nm. Níveis de NPSH foram expressas como µmol SH/g de tecido.

2.4.5 Ensaio de Proteína Carbonilada

Os níveis de proteína carbonilada foram dosados nos girinos por modificação do método descrito por Yan et al. (1995). No ensaio 200 µL do homogeneizado misturados á 800 µl de água destilada e 150 ul de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) [10 nm] em ácido clorídrico 2N foram incubados no escuro em temperatura ambiente. Após incubação durante 60 minutos, foram adicionados sequencialmente: 125 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 3%, 500 mL de etanol e 500 mL de heptano. Esta mistura foi agitada em vórtice durante 30 segundos e centrifugou-se a 3000 rpm durante 15 minutos. Em seguida, a proteína isolada a partir da interface foi lavado por ressuspensão em etanol/acetato de etilo (1:1). Depois adicionou-se 250 µL de SDS a 3% e agitadas novamente. A mistura foi pipetada para uma microplaca. O ensaio foi realizado em duplicata e um tubo em branco incubadas com HCl 2N sem DNPH foi incluída para cada amostra. A absorbância foi medida em modo endpoint a 370 nm. O total de carbonilação foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 22.000 M/cm. O conteúdo carbonil proteína foi expressa como nmol de proteína carbonilada/mg.

2.4.6 Estimativa de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi medida nos girinos por a produção de Ácido Tiobarbitúrico Espécies Reativas (TBARS) e de acordo com método Buege & Aust (1978) com algumas modificações. 100 µL do homogeneizado foi misturado com 100 mL de TCA a 10%, seguido por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min. 100 µl de sobrenadante foi misturado com 100 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) [0,67%]. A mistura foi incubada a 100°C, durante 30 minutos. 150 µl do sobrenadante foi pipetado para microplacas. A absorbância foi lida em modo de ponto final a 532 nm. A peroxidação lipídica (LPO) foi expressa em nmol de MDA/mg proteína.

2.5 Análises dos Dados

Os parâmetros bioquímicos foram analisados utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e expressas como média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de probabilidade de $P < 0,05$ entre tratamentos e controle. Para realização das análises foi utilizado o software GraphPad prism.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade da enzima AChE

Os girinos expostos a 0,5 mg/L de atrazina apresentaram inibição significativa da atividade AChE em comparação ao grupo controle, mas os expostos a 1 e 4,8 mg/L não mostraram diferença em relação ao controle (Figura 2). A comparação entre os tratamentos com atrazina mostrou que a atividade da AChE aumentou com o aumento da concentração do herbicida.

Na exposição à tebuconazole ocorreu inibição da atividade AChE. Ocorreu inibição em todas as concentrações testadas em comparação com o grupo controle (Figura 3). Ocorrendo diferença na concentração 0,15 mg/L comparado aos demais tratamentos.

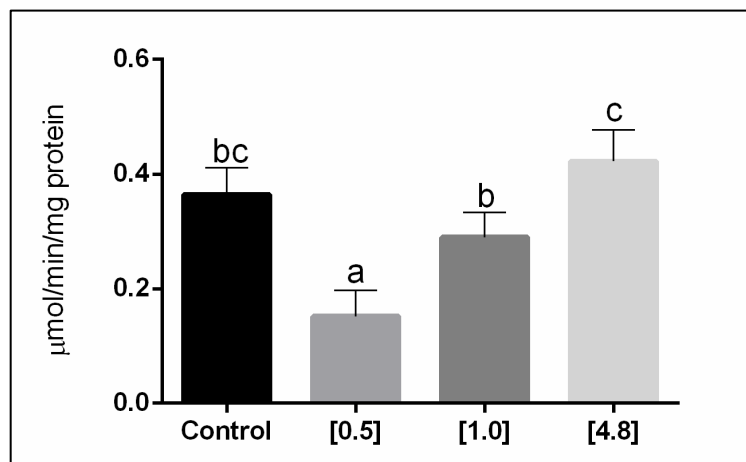


Figura 2 - Atividade AChE em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

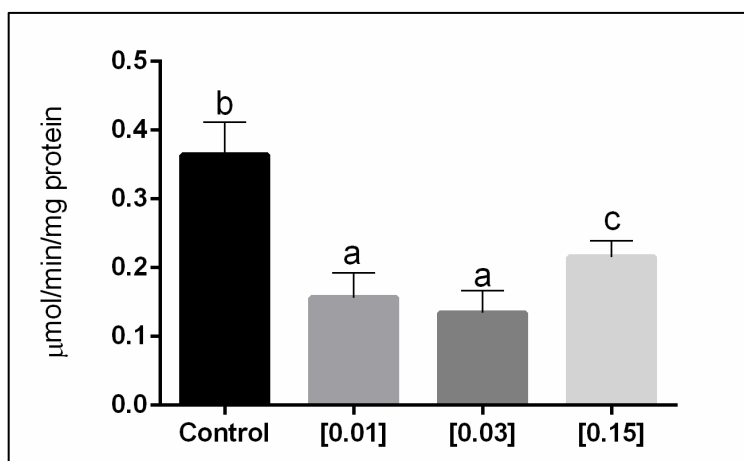


Figura 3 - Atividade AChE em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

3.2 Atividade da enzima GST

A exposição à atrazina aumentou a atividade GST nas concentrações 1 e 4,8 mg/L e não mudou para 0,5 mg/L em comparação com o grupo controle. A atividade foi maior nas duas concentrações mais altas testadas (Figura 4). Na exposição ao tebuconazole a atividade foi mantida nos valores do controle em girinos expostos a 0,03 mg/L e aumentou em 0,01 e 0,15 mg/L comparado ao grupo controle. A atividade da GST foi maior na concentração de 0,15 mg/L comparado aos outros tratamentos (Figura 5).

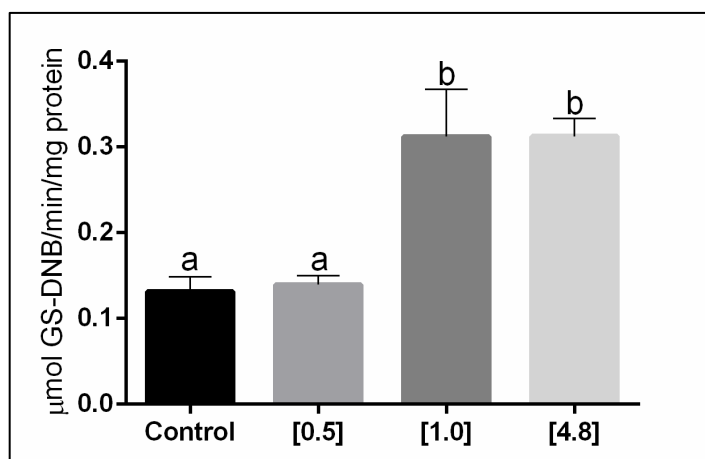


Figura 4 - Atividade GST em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

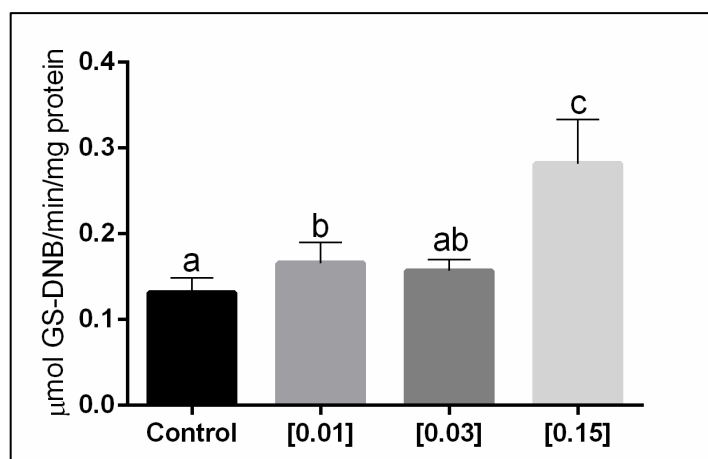


Figura 5 – Atividade GST em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

3.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Atividade SOD aumentou na concentração 4,8 mg/L na exposição a atrazina, não diferindo nas demais concentrações quando comparados ao controle (Figura 6). Nos girinos expostos a tebuconazole não ocorreu diferença significativa na atividade da SOD entre as concentrações testadas com o grupo controle (Figura 7).

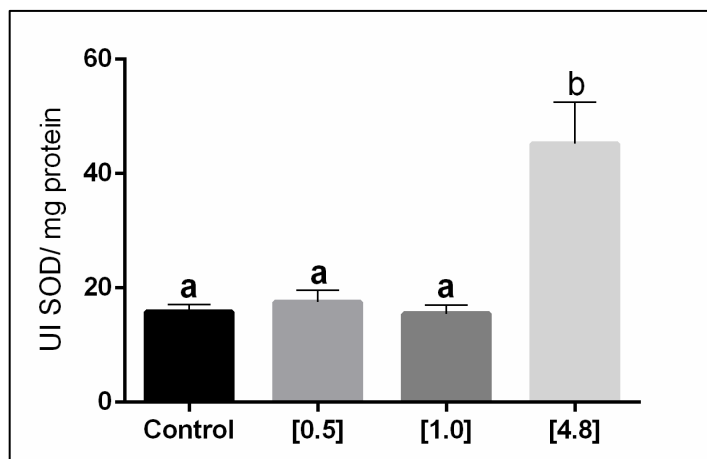


Figura 6 – Atividade SOD em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

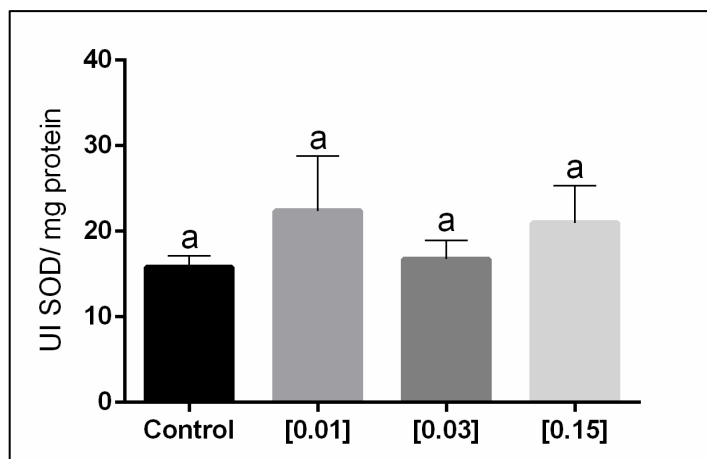


Figura 7 – Atividade SOD em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

3.4 Níveis de tióis não protéicos (NPSH)

A exposição à atrazina ou a tebuconazole não mostrou quaisquer alterações nos níveis de NPSH para todos os grupos expostos (figuras 8 e 9).

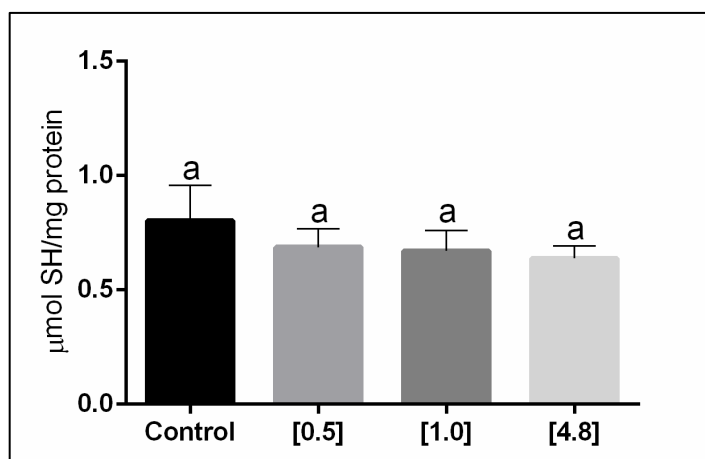


Figura 8 – NPSH em girinos de *Physalemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

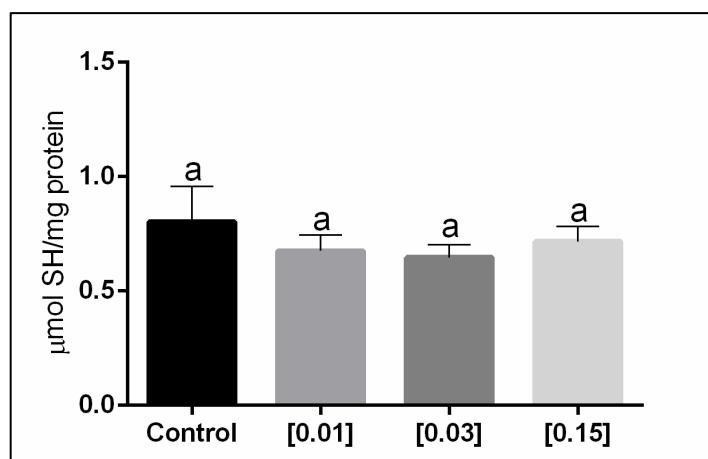


Figura 9 – NPSH em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

3.5 Proteína Carbonilada

Os níveis de proteína carbonil aumentaram em todas as concentrações em girinos expostos a atrazina comparado ao grupo controle, não ocorrendo diferença entre as concentrações testadas (Figura 10). Nos girinos expostos ao tebuconazole não ocorreu alteração nos níveis de proteína carbonil em 0,01 mg/L. Entretanto, ocorreu aumento significativo em 0,03 e 0,15 mg/L em comparação ao grupo controle (Figura 11).

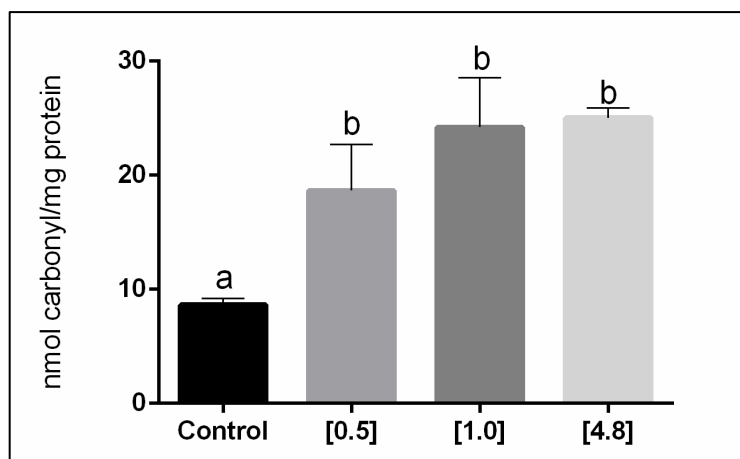


Figura 10 – Carbonil em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

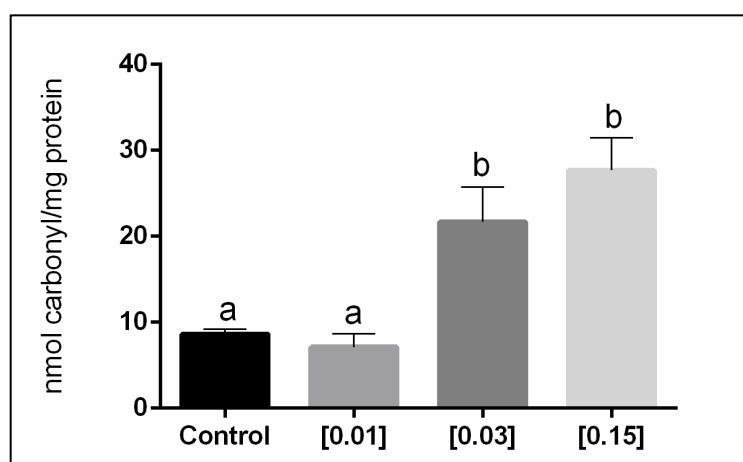


Figura 11 – Carbonil em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

3.6 TBARS

Os girinos expostos a 1 e 4,8 mg/L de atrazina apresentaram níveis mais elevados de TBARS em comparação ao grupo controle, mas naqueles expostos a 0,5 mg/L não houve diferença em relação aos valores do controle (Figura 12). Os girinos expostos ao tebuconazole apresentaram níveis mais elevados de TBARS em

0,15 mg/L. Nas concentrações 0,01 e 0,03 mg/L não foram observadas alterações nos níveis de TBARS comparados ao controle (Figura 13).

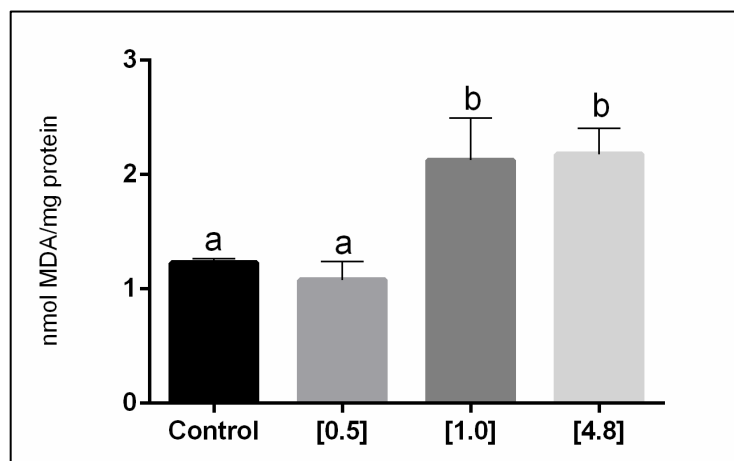


Figura 12 – TBARS em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao herbicida atrazina. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

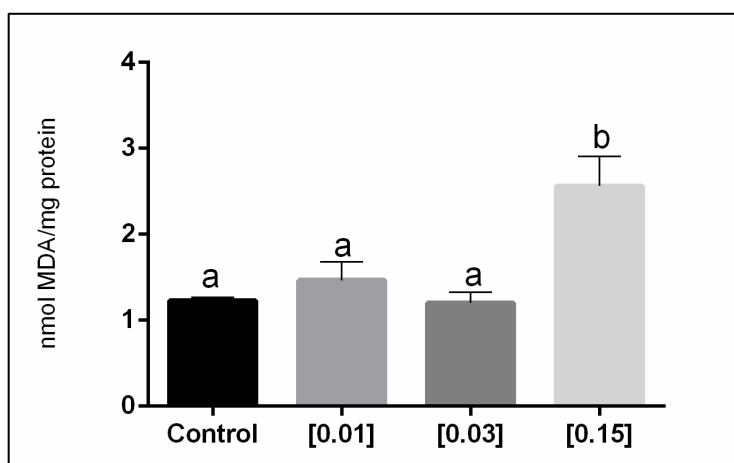


Figura 13 – TBARS em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos ao fungicida tebuconazole. Os dados representam a média $\pm$ SD (n = 6). Diferentes letras mostram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Os agrotóxicos podem induzir dano oxidativo através de vários mecanismos, tais como inativação de antioxidantes e enzimas associadas, levando à diminuição do potencial antioxidante. Outro mecanismo seria o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, causando danos as macromoléculas, e modificação de processos essenciais (BLAHOVÁ, 2013).

Após 21 dias de exposição verificou-se inibição da atividade da AChE em girinos expostos a 0,5 mg/L de atrazina e em todas as concentrações testadas de tebuconazole. Os efeitos inibitórios mostrados neste trabalho em girinos para esta enzima representam o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica. Para corroborar os resultados mostrando a relação entre a inibição enzimática e efeitos no comportamento dos girinos observou-se neste estudo que os animais expostos aos agrotóxicos apresentaram letargia, redução no movimento natatório, bem como nado errático e desorientação. Resultados semelhantes foram encontrados para girinos de *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* e *Xenopus laevis* mostrando inibição de acetilcolinesterase quando expostos ao inseticida methidathion (GÜNGÖRDÜ et al., 2016). A inibição da acetilcolinesterase é um efeito comum em girinos expostos à agrotóxicos. A atividade da AChE foi reduzida em *Rana ridibunda* exposta ao fungicida carbamato (FALFUSHINSKA et al., 2008). Em outras classes de vertebrados como os peixes, observa-se redução da atividade de AChE em carpas expostas à atrazina e ao inseticida clorpirifós (XING et al., 2010). Schmidel et al. (2014) também verificou inibição da acetilcolinesterase em cérebro de zebrafish expostos à atrazina. Os herbicidas clomazone e propanil também causaram inibição da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de carpas expostas a herbicidas utilizados na cultura do arroz irrigado, e expostos nas condições de cultivo do arroz (MORAES et al., 2007; MORAES et al., 2009). Várias classes de agrotóxicos usados na rotina agrícola, como o glifosato inibem a atividade cerebral e muscular de jundiás *Rhamdia quelen* (GLUSCZAK et al., 2007) e piavas *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK, et al., 2006). Os efeitos clássicos da exposição de organismos aquáticos à agrotóxicos de uma forma geral remetem a

efeitos inibitórios. Quando a atividade desta enzima é reduzida, a acetilcolina não é hidrolisada e permanece acumulada nas sinapses, alterando todo o funcionamento normal do sistema nervoso (DUTTA & ARENDS, 2003). O acúmulo de acetilcolina devido à redução da atividade da enzima AChE pode afetar a locomoção e o equilíbrio de organismos e, conseqüentemente, o comportamento de fuga, interferindo diretamente na sobrevivência da espécie (BRETAUD et al., 2000; MORAES et al., 2009). De fato, os efeitos observados tanto para exposição dos girinos à atrazina como tebuconazole estão de acordo com o reportado na literatura acerca dos efeitos de agrotóxicos em organismos aquáticos.

Neste estudo, a exposição aos agrotóxicos atrazina e tebuconazole causaram alterações no perfil antioxidante de girinos de *Physalaemus gracilis*. Os níveis de GST aumentaram na exposição à atrazina nas concentrações mais altas. Observou-se também um aumento da atividade na exposição ao tebuconazole nas concentrações de 0,01 e 0,15 mg/L, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados de forma geral, estão de acordo com o já demonstrado na literatura, onde a atividade da GST pode ser alterada em locais poluídos e que a presença de contaminantes orgânicos pode levar ao aumento da atividade desta enzima (MACHALA et al., 1998). O aumento da atividade GST é uma resposta esperada uma vez que esta enzima está envolvida na biotransformação de vários poluentes e tem função importante na proteção dos tecidos contra os efeitos de xenobióticos (FERRARI et al., 2007; WANG et al., 2009). Os resultados do presente estudo estão de acordo com relatos da literatura considerando outros agrotóxicos em girinos expostos, onde também foi constatado o aumento da atividade da GST. Girinos de *Pelophylax ridibundus* e *Xenopus laevis* expostos ao methidathion mostraram aumento de GST (GÜNGÖRDÜ et al., 2013; GÜNGÖRDÜ et al., 2016), assim como *Bufo regularis* expostos à endosulfan e diazinon (EZEMONYE & TONGO, 2010). Em contrapartida, levando em consideração as diferenças inerentes a cada espécie e classe química de agrotóxico, foram relatados inibição da GST em *Rhinella arenarum* (LAJMANOVICH et al., 2011), *Bufo viridis* e *Xenopus laevis* (GÜNGÖRDÜ et al., 2016) expostos a glifosato e *Scinax fuscovarius* expostos a fipronil (MARGARIDO et al., 2013). Em um estudo de campo onde foram comparadas as atividades de GST em anfíbios adultos coletados em áreas de cultivo de soja e campos não impactados. Os autores relataram a inibição da GST hepática nos animais coletados nas áreas de cultivos, onde foram expostos a cipermetrina,

endosulfan, clorpirifós, atrazina e glifosato (BRODEUR, et al., 2011). Devido ao papel que as GSTs desempenham, a indução destas enzimas são consideradas como benéfico para lidar com uma condição de estresse. A inibição da GST pode ser causada por falha do processo de desintoxicação e o desenvolvimento de dano oxidativo (CATTANEO et al., 2012). Estudos com peixes também mostraram a inibição da atividade da GST por atrazina (MELA et al., 2013) e tebuconazole (TONI et al., 2011). Recentemente Snyder e colaboradores (2017) verificaram que a exposição à atrazina interfere negativamente em várias rotas metabólicas associadas com a obtenção de energia e metabolismo de purinas em duas espécies de anfíbios: *Anaxirus americanus* e *Hyla versicolor*. O presente estudo mostra claramente a resposta dos girinos, aumentando a atividade da GST que atua detoxificando o organismo de contaminantes químicos. Neste caso a espécie *Physalaemus gracilis* do estudo, foi capaz de remover pelo menos parcialmente possíveis resíduos de atrazina ou tebuconazole, mostrando uma resposta positiva em relação ao acúmulo destes agroquímicos no organismo.

Entre as enzimas chave para a desintoxicação de ROS em todos os organismos, a superóxido dismutase (SOD) é essencial para a conversão de ROS em metabolitos inofensivos e pode ser aumentada ou inibida sob estresse químico (TONI et al., 2011; TONI et al., 2013). Neste estudo, somente a concentração mais alta do herbicida atrazina causou aumento na atividade SOD. Possivelmente concentrações mais baixas de atrazina, bem como a exposição ao tebuconazole não foram suficientes para causar alterações na atividade da superóxido dismutase neste estudo. O aumento na atividade de enzimas antioxidantes contribui para a eliminação de ROS, que são induzidos por exposição a xenobióticos. O aumento de enzimas como a SOD está relacionado às adaptações do organismo em situações de estresse induzida por contaminantes (LIVINGSTONE, 2001; BLAHOVÁ et al., 2013). Em girinos de *Bufo bufo gargarizans* expostos à um inseticida (spirotetramat) usado em culturas de vegetais e frutas, foi observado aumento da atividade da SOD em 4 dias de exposição (YIN et al., 2014). Girinos de *Lithobates catesbeiana* expostos à glifosato também apresentaram aumento da atividade da SOD em fígado (COSTA et al., 2008). Estudos com peixes também demonstraram aumento de atividades da enzima SOD quando expostos a atrazina (BLAHOVÁ et al., 2013; NWANI et al., 2010). No presente estudo, a atrazina não altera a atividade da SOD

em 0,5 e 1,0 mg/L, assim como *Rhamdia quelen* não apresentou alteração na atividade SOD quando exposto à atrazina (MELA et al., 2013).

Os tióis não protéicos (NPSH) em sua maioria, representados pela glutatona (GSH), possuem um papel central na defesa antioxidante, contribuindo para uma série de processos, tais como a limpeza de radicais livres, redução de peróxidos e desintoxicação de compostos químicos (CNUBBEN et al., 2001). No presente estudo, não ocorreram alterações nos níveis de NPSH para todos os grupos expostos à atrazina e tebuconazole. Esta resposta não representa uma defesa contra os efeitos dos agrotóxicos testados e está de acordo com um estudo de campo onde, não houve alteração nos níveis de GSH em anfíbios adultos coletados em lavouras de soja (BRODEUR et al., 2011). Girinos de *Rhinella arenarum* também apresentaram redução de GSH quando expostas a diferentes concentrações do inseticida azinfos metilo (ROSENBAUM et al., 2012). Estudos com peixes mostraram respostas diferentes, o aumento de níveis de tióis não proteicos em *Channa punctata* em exposição ao inseticida deltametrina (KAUR et al., 2011) e redução na exposição ao fungicida propiconazole (TABASSUM et al., 2016).

A exposição à atrazina causou oxidação de proteínas nos girinos. Este efeito foi observado pelo aumento de proteína carbonil em todas as concentrações de atrazina testadas, quando comparadas ao controle. Observou-se também um aumento de proteína carbonil na exposição ao tebuconazole nas concentrações de 0,03 e 0,15 mg/L. A oxidação de proteínas observada no presente estudo pode ser causada pelo aumento de espécies reativas, as quais induzem danos em várias macromoléculas, incluindo lipídeos e proteínas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas continuamente nos organismos vivos, devido aos processos de oxidações biológicas e posteriormente de acordo com a quantidade formada, causa dano oxidativo nos organismos. De uma forma geral o aumento de ROS induz a uma oxidação de proteínas (OLIVER, 1987; VALAVANIDIS et al., 2006; FERREIRA et al., 2010; TONI et al., 2010). O aumento de proteína carbonil observado no presente estudo está de acordo com o papel proposto para a proteína carbonil como um indicador de danos celulares. A exposição ao tebuconazole também causou aumento de proteína carbonil em *Rhamdia quelen* (FERREIRA et al., 2010). Oxidação de proteínas também foi encontrado em *Channa punctata* expostos ao fungicida propiconazole (TABASSUM et al., 2016), como também em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao herbicida clomazone (CATTANEO et al., 2012). A

carbonilação de proteínas observada no presente estudo pode estar relacionada ao aumento de níveis de TBARS devido à formação de ROS. Neste estudo, também foi verificado o aumento dos níveis de TBARS nas concentrações mais altas: 1 e 4,8 mg/L de atrazina e 0,15 mg/L de tebuconazole, sugerindo dano lipídico aos tecidos dos girinos. A alteração nas atividades de peroxidação lipídica é um dos principais processos de estresse oxidativo causado por xenobióticos como agrotóxicos em organismos aquáticos (NWANI et al., 2013).

A geração de TBARS causado pela exposição dos girinos nas concentrações mais altas de atrazina e tebuconazole é uma clara indicação de peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS aumentados encontrados indicam claro dano oxidativo, pois as defesas antioxidantes do animal não foram suficientes para neutralizar os ROS, levando à ocorrência de peroxidação lipídica. A ausência de efeito nas concentrações mais baixas na geração de TBARS indicam que *Physalaemus gracilis* resistiu ao dano lipídico através de outros mecanismos antioxidantes, prevenindo um aumento da peroxidação lipídica. Um dos mecanismos pode ser a detoxificação através da GST, enzima que apresentou aumento de atividade para ambos agrotóxicos testados. Produtos lipofílicos da biotransformação de certos xenobióticos são conjugados com a glutathione reduzida (GSH) pela enzima glutathione S-transferase (GST), formando produtos mais solúveis e, facilitando a excreção dos mesmos (TRIDICO et al., 2010). Este pode ser um mecanismo utilizado pelos girinos para prevenir a peroxidação lipídica observada no presente estudo.

Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos que relatam aumento nos níveis de peroxidação lipídica em organismos aquáticos expostos a diferentes tipos de contaminantes. Por exemplo, houve aumento na peroxidação lipídica em girinos expostos aos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac (COSTA et al., 2008; DAVID et al., 2012; DORNELLES & OLIVEIRA, 2014). Em estudos com peixes foi confirmada elevado nível de peroxidação lipídica em resposta a exposição à atrazina (ELIA et al., 2002; NWANI et al., 2010) e também aos herbicidas glifosato (GLUSCZAK et al., 2007) e clomazone (CRESTANI et al., 2007; CATTANEO et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados na exposição a tebuconazole em *Rhandia quelen* (FERREIRA et al., 2010) e *Cyprinus carpio* (TONI et al., 2011) e em *Channa punctata* expostos ao fungicida propiconazole (TABASSUM et al., 2016).

As respostas aos danos oxidativos causados por estressores ambientais são um mecanismo adaptativo que permite a sobrevivência dos organismos.

Dependendo da intensidade do estressor, os animais podem ser incapazes de tolerar as mudanças que se seguem e exibir reações tais como inibição do crescimento, reprodução ou resposta imunitária reduzida (LIMA al., 2006; DORNELLES & OLIVEIRA, 2016). O uso de reservas de energia para manter a homeostase e a sobrevivência dos animais pode influenciar outros parâmetros biológicos, tais como desenvolvimento e sucesso reprodutivo (DORNELLES & OLIVEIRA, 2016). Em resumo a exposição ao herbicida atrazina e ao fungicida tebuconazole induz dano oxidativo em *Physalaemus gracilis* expostos em condição in vivo. A espécie mostrou uma clara resposta aos danos oxidativos gerados pela exposição aos agrotóxicos, e os marcadores de dano e antioxidantes utilizados poderão ser utilizados futuramente em estudos de campo para avaliação de áreas impactadas.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que atrazina e tebuconazole podem causar efeitos indutores de dano oxidativo em girinos de *Physalaemus gracilis*. O aumento da peroxidação lipídica e proteína carbonil sugere que os danos oxidativos induzidos afetam lipídeos e proteínas podendo causar danos á atividade enzimática devido a oxidação de proteínas. A utilização de biomarcadores é uma ferramenta importante para avaliar a sensibilidade de uma espécie em seu ambiente, pois a resposta a diferentes compostos são específicos de cada espécie. Nossos resultados mostraram o potencial de atrazina e tebuconazole para causar dano oxidativo durante o estágio larval de *Physalaemus gracilis*.

6 REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D.; LOUREIRO, A.P.M.; MARTINEZ, G.R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L.F.; GARCIA, C.C.M.; PRADO, F.M.; RONSEIN, G.E. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 145A, p. 588-600, 2007.

ALPUCHE-GUAL L.; GOLD-BOUCHOT, G. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 787-797, 2008.

ALMROTH, B.C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 171-180. 2005.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170. 2003.

ATTADEMO, A.M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.; LAJMANOVICH, R.C.; PAOLA M. PELTZER, P.M.; JUNGES, C.; BASSO, A. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). **Ecotoxicology**, v. 20, p. 274-282, 2011.

BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, Zs.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in Carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 33, p. 279-295, 1995.

BLAHOVÁ, J.; PLHALOVÁ, L.; HOSTOVSKÝ, M.; DIVIŠOVÁ, L.; RADKA DOBŠIKOVÁ, R.; IVANA MIKULÍKOVÁ, I.; ŠTEPÁNOVA, S.; SVOBODOVÁ, Z. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 82-85, 2013.

BRETAUD, S., TOUTANT, J.P., SAGLIO, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*).

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 47, p. 117-124.

BRODEUR, J.C.; SUAREZ, R.P.; NATALE, G.S.; RONCO, A.E.; ZACCAGNINI, M.E. 2011. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production áreas. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1370-1380, 2011.

BRODEUR, J.C.; CANDIOTI, J.V.; SOLONESKI, S. LARRAMENDY, M.L.; RONCO, A.E. Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an Agroecosystem Experiencing Severe Drought. **Journal of Herpetology**, v. 46, p. 72-78, 2012.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** v. 52, p. 302-309.

CATTANEO, R.; MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; MENEZES, C., SARTORI, G.M.; CLASEN, B.; DE AVILA, L.A.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R., (2012). Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 97-106, 2012.

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 133, p. 256-260, 2001.

CLASEN, B.; LORO, V.L.; CATTANEO, R.; MORAES, B.; LÓPES, T.; AVILA, L.A.; ZANELLA, R.; REIMCHE, G.B.; BALDISSEROTTO, B. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice-fish cultivation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 77, p. 45-51, 2012.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.CM.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141-152, 2001.

COSTA, M.J., MONTEIRO, D.A., OLIVEIRA-NETO, A.L., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup original. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153-163, 2008.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F.F.; ZANELLA, R.; LORO, V.L. (2006). Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 6, p. 2305-2311, 2007.

DAVID, M. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 127-134, 2012.

DORNELLES, M.F.; OLIVEIRA, G.T. (2015). Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 1610–1620, 2016.

DUTTA, H.M.; ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**, v. 91, p. 157-162, 2003.

ELIA, A.C.; WALLER, W.T.; NORTON, S.J. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 809–816, 2002.

ELLMAN, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES J.R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95.

EZEMONYE, L.; TONGO, I. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). **Chemosphere**, v. 81, p. 214–217, 2010.

FALFUSHINSKA, H.; LOUMBOURDIS, N.; ROMANCHUK, L.; STOLYAR, O. Validation of oxidative stress response in two populations of frogs from Western Ukraine. **Chemosphere**, v. 73, p. 1096-1111, 2008.

FAROMBI; E.O.; ADELOWO; O.A.; AJIMOKO, Y.R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as Indicators of environmental pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 4, p. 158-165, 2007.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.M.; D'ANGELO, P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.134-142, 2007.

FERREIRA, D.; MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, p. 914-921, 2010.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M.B; PEDRON, F.A; DUARTE, M.F.; VIEIRA, V.L.P. (2005). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 237–241, 2006.

GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., MORAES, B.S., SIMOES, R.R., SCHETINGER, M.R.C., MORSCH, V.M., LORO, V.L. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 519-524.

GRIPP, H.S.; FREITAS, J.S.; ALMEIDA, E.A.; BISINOTI, M.C.; MOREIRA, A.B. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p.173-179, 2017.

GÜNGÖRDÜ, A. Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 140-141, p. 220-228, 2013.

GÜNGÖRDÜ, A.; UÇKUN, M.; YOĞLU, E. (2015). Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. **Chemosphere**, v. 144, p. 2024-2035, 2016.

HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

KAUR, M.; ATIF, F.; ANSARI, R.A.; AHMAD, F.; RAISUDDIN, S. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, p. 216-224, 2011.

LAJMANOVICH , R.C.; ATTADAMO, A.M.; PELTZER , P.M.; JUNGES , C.M.; CABAGNA, M.C. Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 681-689, 2011.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348-354, 2009.

LANGONE, J.A. **Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos)**. Museo Damaso Antonio Larrañaga, Serie Divulgación, v. 5, p. 1-123, 1994.

LIMA, L.C.; RIBEIRO L.P.; LEITE R.C.; MELO, D.C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 113-117, 2006.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

MACHALA, M.; DRÁBEK, P.; NECA, J.; KOLÁROVÁ, J.; SVOBODOVÁ, Z. Biochemical Markers for Differentiation of Exposures to Nonplanar Polychlorinated Biphenyls, Organochlorine Pesticides, or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Trout Liver. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 107-111, 1998.

MARAN, M.; FERNÁNDEZ, M.; BARBIERI, P.; FONT, G.; RUIZ, M.J.; Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 922-930, 2009.

MARGARIDO, T.C.S.; FELÍCIO, A.A.; ROSSA-FERES, D.C.; ALMEIDA, E.A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61-67, 2013.

MENEZES, C.; MARINS, A.; MURUSSI, C.; PRETTO, A.; LEITEMPERGER, J.; LORO, V.L. Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 231-237, 2016.

MENEZES, C.; LEITEMPERGER, J.; MURUSSI, C.; VIERA, M.S.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R.; LORO, V.L. Effect of diphenyl diselenide diet supplementation on oxidative stress biomarkers in two species of freshwater fish exposed to the insecticide fipronil. **Fish Fisiology Biochemistry**, v. 42, p. 1357-1368, 2016a.

MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; RANDI, M.A.F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PEREIRA, L.; MARASCHI, A.C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A.; SILVA DE ASSIS, H.C. 2012. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13-21, 2013.

MIRON, D.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M.A.; MORAES, G.; VIEIRA, V.L.P. 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 61, 398-403.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. (1972). The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. (2009). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, Part C, p. 141–149, 2006.

MORAES, B.S.; LORO, V.L.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S.O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*), **Chemosphere**, v. 68, p.1597-1601, 2007.

MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; FONCECA, M.B.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; REIMCHE, G.B.; AVILA, L.A. (2008). Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 57-62, 2009.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. "Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control." **Annual Review of Plant Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

NWANI, C.H.D., LAKRA, W.S., NAGPURE, N.S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B., SRIVASTAVA, S.K. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 3298-3312, 2010.

NWANI, C.D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W.S. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish *Channa punctatus*. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 36, p. 539-547, 2013.

OLIVER, C.N. 1987. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 15, p. 62-72.

OROPESA, A.L.; CAMBERO, J.P.G.; SOLER, F. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology**, v. 23, p. 285-293, 2009.

OSSANA, N.A.; CASTAÑÉ, P.M.; SALIBIÁN, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, p. 486-497, 2003.

ROSENBAUM, E.A.; DUBOSCQ, L.; SOLEÑO, J.; MONTAGNA, C.M.; FERRARI, A.; VENTURINO, A. Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in north Patagonia, Argentina. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2311-2317, 2012.

SANCHO, E.; CERÓN, J.J.; FERRANDO, M.D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 81-86, 2000.

SCHMIDEL, A.J.; ASSMANN, K.L.; WERLANG, C.C.; BERTONCELLO, K.T.; FRANCESCON, F.; RAMBO, C.L.; BELTRAME, G.M.; CALEGARI, D.; BATISTA, C.B.; BLASER, R.E.; JÚNIOR, W.A.R.; CONTERATO, G.M.M.; PIATO, A.L.; ZANATTA, L.; DAL MAGRO, J.; ROSEMBERG, D.B. Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 44, p. 62–69, 2014.

SHAO, B.; ZHU, L.; DONG, M.; WANG, J.; WANG, J.; XIE, H.; ZHANG, Q.; DU, Z.; ZHU, S. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebra fish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1533-1540, 2012.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SNYDER, M.N.; HENDERSON, W.M.; GLINSKI, D.A.; PURUCKER, S.T. (2016). Biomarkers analysis of American toad (*Anaxyrus americanus*) and grey tree frog (*Hyla versicolor*) tadpoles following exposure to atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 184-193, 2017.

TABASSUM, H.; DAWOOD, A.Q.; SHARMA, P.; KHAN, J.; RAISUDDIN, S.; PARVEZ, S. (2015). Multi-organ toxicological impact of fungicide propiconazole on biochemical and histological profile of freshwater fish *Channa punctata* Bloch. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 359–365, 2016.

TONI, C.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; CLASEN, B.E.; CATTANEO, R.; SANTI, A.; PRETTO, A.; ZANELLA, R.; LEITEMPERGER, J. (2009). Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 590-595, 2010.

TONI, C.; FERREIRA, D.; KREUTZ, L.C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. **Chemosphere**, v. 83, p. 579–584, 2011.

TONI, C.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; LEITEMPERGER, J.; PRETTO, A.; ADAIME, M.B.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R.; LORO, V.L. Oxidative stress in carp exposed to quinclorac herbicide under rice field condition. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 27–31, 2013.

TRIDICO, C.P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to benzo[a]pyrene and diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 858-863, 2010.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

YAN, L.J., TRABER, M.G., PACKER, L. 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 228, p. 349–351.

YIN, X.; JIANG , S.; YU, J.; ZHU , G.; WU , H.; MAO, C. (2013). Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinesetoad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 1229-1235, 2014.

WANG, C; LU, G.; CUI, J.; WANG, P. Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 414-419, 2009.

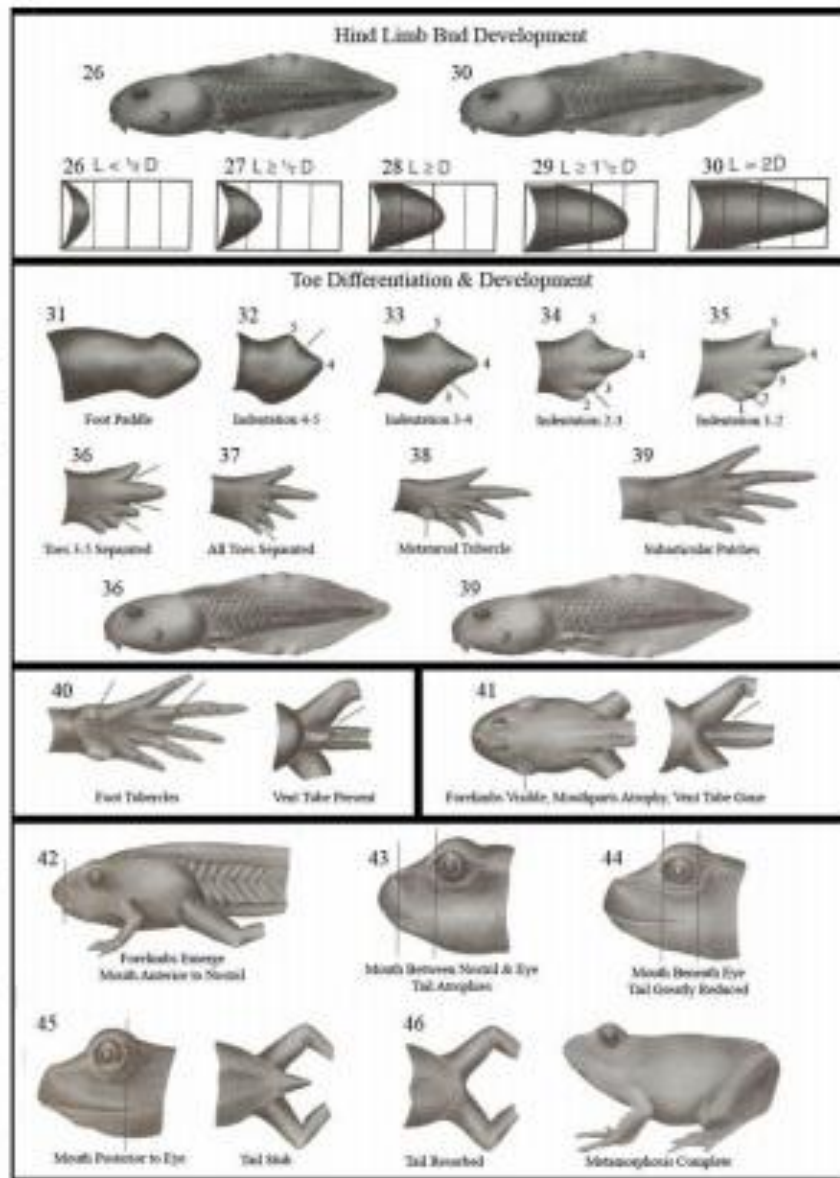
VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

XING, H.; WANGA, J.; LI, J.; FAN, Z.; WANGA, M.; XUA, S. (2009). Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and Carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 26-30, 2010.

CONCLUSÕES

- Em termos de toxicidade aguda o fungicida com princípio ativo tebuconazole mostrou-se mais tóxico para a espécie *Physalaemus gracilis* comparado ao princípio ativo atrazina.
- Os agrotóxicos atrazina e tebuconazole foram tóxicos para *Physalaemus gracilis* e a mortalidade dos girinos foi maior nas dosagens mais altas de ambos os agrotóxicos.
- O comprimento e peso dos girinos não foram afetados na exposição aos dois agrotóxicos em estudo.
- As doses subletais causaram deformidades em todas as concentrações testadas para ambos agrotóxicos, principalmente na cavidade oral desta espécie.
- A inibição da atividade AChE representam o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica causado pelo efeito tóxico dos agrotóxicos.
- A exposição aos agrotóxicos causaram alterações no perfil antioxidante dos girinos de *Physalaemus gracilis*, observado pelo aumento da atividade GST que evidencia a tentativa de biotransformação e proteção dos tecidos contra os efeitos dos agrotóxicos. Também ocorreu aumento da atividade SOD que pode estar relacionado com a tentativa de neutralizar as EROs.
- Não foram observadas alterações nos tióis. Esta resposta não representa uma defesa contra os efeitos dos agrotóxicos testados.

- O aumento dos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas evidenciam uma situação de dano oxidativo para os dois agrotóxicos em estudo.

L
A
R
V
A
E

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal da Fronteira Sul
Campus de Realeza

CR 019/CEUA/UFS/2015

Realeza/PR, 10/11/2015.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “*Avaliação da toxicidade de Atrazina, Cypermetrina e Tebuconazol em girinos de Rhinela icterina (Anura: Bufonidae) e Physalaemus cuvieri (Anura: Leptodactylidae)*”, protocolo nº 23205.003458/2015-12, sob a responsabilidade de **Marília Teresinha Hartmann** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFS, em reunião realizada dia **09/11/2015**.

Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO	ou 50398.
Atividade (s)	Animal teste ou animal modelo para estudos de ecotoxicologia envolvendo o agroquímico Atrazina, Cypermetrina e Tebuconazole.
Espécies/Grupos Taxonômicos	Physalaemus cuvieri e Rhinela icterica.
Local (is)	Os animais serão mantidos em Laboratórios de Ecologia e Conservação – UFS Campus Erechim.

Atenciosamente,


COORDENADORA DA CEUA-COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Universidade Federal da Fronteira Sul-UFS
Denise Maria Sousa de Mello
Coordenadora da CEUA/UFS

ANEXO C – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA PELO ICMBio.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50398-1	Data da Emissão: 28/09/2015 17:23	Data para Revalidação*: 27/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marília Teresinha Hartmann	CPF: 507.015.680-20
Título do Projeto: Avaliação da toxicidade de Atrazina, Cypermetrina e Tebuconazol em girinos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	CNPJ: 11.234.780/0001-50

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento bibliográfico	09/2015	09/2016
2	Reconhecimento de espécie de anuros, coleta de desovas	09/2015	05/2016
3	Criação de girinos para experimentos	09/2015	05/2016
4	Testes de ecotoxicidade	10/2015	05/2016
5	Testes de genotoxicidade	11/2015	05/2016
6	Análise dos dados	12/2015	07/2016
7	Confecção de relatórios e artigos científicos para publicações	06/2016	09/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1) Para os testes de toxicidade, este projeto contempla a obtenção de girinos a partir de desovas (amostra biológica) a serem coletadas na natureza; 2) As coletas in situ de adultos dar-se-ão no número máximo de dez (10) exemplares para cada família contemplada do projeto, visando a obtenção de espécimes-testemunhos; 3) Esta Autorização SISBIO não insenta a proponente, e demais membros da equipe, de obter o parecer do CEUA/Universidade Federal da Fronteira Sul, quanto aos procedimentos laboratoriais que visam a realização dos testes de toxicidade.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Camila Fatima Rutkoski	Pesquisador	027.916.900-00	7112056333 SSP-RS	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 67992447



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50398-1	Data da Emissão: 28/09/2015 17:23	Data para Revalidação*: 27/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marília Teresinha Hartmann	CPF: 507.015.680-20
Título do Projeto: Avaliação da toxicidade de Atrazina, Cypermethrina e Tebuconazol em girinos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	CNPJ: 11.234.780/0001-50

2	Paulo Afonso Hartmann	Pesquisador	673.713.450-53	3047730977 SSP-RS	Brasileira
3	Guilherme Victor Vanzetto	Pesquisador	020.914.760-13	7090408761 SESP-RS	Brasileira
4	Gregori Betiati Bieniek	Pesquisador	018.118.170-33	5105014657 SJS-RS	Brasileira
5	Cassiane Kolcenti	Pesquisador	994.974.840-20	7070318824 SSP-RS	Brasileira
6	Paola Flores Sturza	Pesquisadora	020.403.930-48	1098515073 ssp-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	ERECHIM	RS	Poças temporárias dentro da UFFS (Universidade)	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Bufonidae, Leiuperidae, Hylidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Hylidae, Leiuperidae, Bufonidae
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Leiuperidae (*Qtde: 10), Hylidae (*Qtde: 10), Bufonidae (*Qtde: 10)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Bufonidae, Hylidae, Leiuperidae

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Ovos, Sangue
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	colecção
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 67992447



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50398-1	Data da Emissão: 28/09/2015 17:23	Data para Revalidação*: 27/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marília Teresinha Hartmann	CPF: 507.015.680-20
Título do Projeto: Avaliação da toxicidade de Atrazina, Cypermetrina e Tebuconazol em girinos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	CNPJ: 11.234.780/0001-50

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 67992447



Página 3/3