



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

CAMILA FATIMA RUTKOSKI

**TOXICIDADE DE TRÊS INSETICIDAS EM UM VERTEBRADO NÃO ALVO,
USANDO COMO MODELO *PHYSALAEMUS GRACILIS* (ANURA:
LEPTODACTYLIDAE)**

ERECHIM

2019

CAMILA FATIMA RUTKOSKI

**TOXICIDADE DE TRÊS INSETICIDAS EM UM VERTEBRADO NÃO ALVO,
USANDO COMO MODELO *PHYSALAEMUS GRACILIS* (ANURA:
LEPTODACTYLIDAE)**

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.

Orientadora: Marília Teresinha Hartmann
Coorientadora: Vania Lúcia Loro

ERECHIM
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
Rua General Osório, 413D
CEP: 89802-210
Caixa Postal 181
Bairro Jardim Itália
Chapecó - SC
Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Rutkoski, Camila Fatima

TOXICIDADE DE TRÊS INSETICIDAS EM UM VERTEBRADO NÃO
ALVO, USANDO COMO MODELO *PHYSALAEMUS GRACILIS* (ANURA:
LEPTODACTYLIDAE) / Camila Fatima Rutkoski. -- 2019.
97 f.

Orientador: Doutora Marília Teresinha Hartmann.

Co-orientador: Doutora Vania Lúcia Loro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental-PPGCTA, Erechim, RS, 2019.

1. Anfíbio. 2. Inseticida. 3. CL50. 4. Malformações.
5. Biomarcadores bioquímicos. I. Hartmann, Marília
Teresinha, orient. II. Loro, Vania Lúcia, co-orient.
III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**TOXICIDADE DE TRÊS INSETICIDAS EM UM VERTEBRADO NÃO ALVO,
USANDO COMO MODELO *PHYSALAEMUS GRACILIS* (ANURA:
LEPTODACTYLIDAE)**

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.

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca em:

21/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marília Teresinha Hartmann
Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim - PPGCTA

Profa. Dra. Vania Lúcia Loro
Universidade Federal de Santa Maria - PPGBTOx

Dra. Bibiana Silveira Moraes
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Profa. Dra. Rosilene Kaizer Perin
Instituto Federal do Rio Grande Sul – *Campus* Sertão – IFRS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta conquista e por todas as oportunidades;

Aos meus pais, por todo amor, incentivo e confiança em mim depositada;

Aos meus irmãos, pelos momentos de distração e suporte em mais etapa;

Às minhas tias e família por todo apoio recebido;

À minha orientadora Professora Marília T. Hartmann, pela oportunidade, amizade, atenção e conhecimentos transmitidos durante todos esses anos;

À minha coorientadora Vania Lúcia Loro pelos ensinamentos, oportunidade e contribuição fundamental para realização das análises bioquímicas no laboratório da UFSM;

Aos colegas de laboratório da UFFS Natani Macagnan, Alexandre Folador e Vrandrieli J. Skovronski por todo auxílio no desenvolvimento dos ensaios, paciência e compreensão;

Às colegas do laboratório da UFSM Aline M. B. do Amaral, Aline T. Marins, Jossiele Leitemperger e Maiara Dorneles pela ajuda fundamental na realização das análises, cálculos, esclarecimento de dúvidas, etc.

Às minhas amigas Suellén T. Ferrazzo, Natani Macagnan e Marluci M. Dariva, pelo apoio, parceria e momentos de descontração.

Aos técnicos Suzana, Flávia, Angela, Davison e Isabelli por toda atenção e suporte no desenvolvimento das atividades do laboratório.

Aos professores do curso pelos ensinamentos.

À professora Rosi pelas contribuições voltadas a dissertação na disciplina de Bioquímica e a Helen pelo auxílio nas análises estatísticas;

A UFFS e ao PPGCTA pelo empenho no aperfeiçoamento de profissionais;

A Capes, pela bolsa concedida;

A outros que não foram mencionados, mas, que de alguma forma auxiliaram ou torceramem mais esta conquista.

RESUMO

A utilização de agrotóxicos na agricultura vem sendo uma crescente preocupação em países em desenvolvimento devido à poluição não pontual de diferentes compartimentos como o ambiente aquático. *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae), popularmente conhecida como rã chorona, é uma espécie de anfíbio amplamente distribuída no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina e encontrada em fontes de água próximas a agroecossistemas. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda (letal) e crônica (subletal) de uma formulação comercial a base de clorpirifós e, a toxicidade subletal de uma formulação a base de cipermetrina e outra de fipronil, em larvas de *Physalaemus gracilis*. Para obtenção das larvas foram coletadas desovas totais na natureza com menos de 24 horas de oviposição. Os ensaios de toxicidade iniciaram quando as larvas atingiram o estágio 25 de Gosner (1960). Para a determinação da toxicidade aguda foi realizado o ensaio por 96 horas e para toxicidade crônica, 168 horas. Os efeitos subletais observados foram alterações na atividade natatória, na morfologia oral e em biomarcadores bioquímicos para clorpirifós. Para cipermetrina e fipronil foram determinados somente biomarcadores bioquímicos. Os biomarcadores determinados foram: AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, proteína carbonil e TBARS. A CL₅₀ de clorpirifós para larvas de *P. gracilis* foi de 893,59 µg.L⁻¹. Para clorpirifós, as larvas apresentaram mobilidade reduzida e espasmos bem como anomalias morfológicas na boca e no intestino. Houve redução na atividade da AChE e aumento na atividade da CAT, SOD, GST e, nos níveis de NPSH e de proteína carbonil. Para cipermetrina houve efeito hormético para a atividade da AChE. Ocorreu inibição de BChE e CAT e ativação da SOD e GST. Já para fipronil, houve inibição da AChE, BChE e SOD e, aumento da CAT e GST. Os níveis de proteínas carboniladas aumentaram para cipermetrina e fipronil. Nesse estudo *P. gracilis* foi sensível a concentrações ambientalmente relevantes ou que podem ser encontradas em seu habitat natural. Os três inseticidas demonstraram potencial de efeito neurotóxico e de indução de dano oxidativo para a espécie. Os efeitos verificados nos biomarcadores bioquímicos de *P. gracilis* indicam que é possível utilizá-los para fins de monitoramento da toxicidade de agrotóxicos em anfíbios e para evitar que efeitos irreversíveis ocorram na sua população e no ecossistema.

Palavras-chave: Anfíbio. Inseticida. CL₅₀. Malformações. Biomarcadores bioquímicos.

ABSTRACT

Agrochemicals used in agriculture has been a growing concern in developing countries due to the non-point pollution of different compartments such as the aquatic environment. *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae), popularly known as chorona frog, is a species of amphibian widely distributed in southern Brazil, Uruguay, Paraguay and Argentina and found in water sources close to agroecosystems. The aim of this study was to evaluate the toxicity of chlorpyrifos, cypermethrin and fipronil commercial formulation in *P. gracilis*. To evaluate the lethal and sublethal effects of chlorpyrifos commercial formulation, acute and chronic toxicity assays were performed in *P. gracilis*, and to evaluate the sublethal effects of cypermethrin and fipronil commercial formulation, chronic assay were performed. To obtain the larvae, total spawnings were collected in the wild with less than 24 hours of oviposition. Toxicity assays were initiated when larvae reached stage 25 of Gosner (1960). Acute assay had a duration of 96 h and chronic assay 168 h. Ten larvae were placed in a glass container containing 500 mL solution of different concentrations of the insecticide, with 6 replicates, totaling 60 larvae for each treatment. Control was carried out in the same design, without addition of the insecticide in the water. The sublethal effects observed were changes in swimming activity, oral morphology and biochemical biomarkers for chlorpyrifos. Only biochemical biomarkers were determined for cypermethrin and fipronil. The biomarkers determined were: AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, carbonyl protein and TBARS. LC50 of chlorpyrifos for larvae of *P. gracilis* was 893,59 $\mu\text{g.L}^{-1}$. For chlorpyrifos, larvae showed reduced mobility and spasms and morphological abnormalities were found in the mouth and intestine. There was a reduction in AChE activity and an increase in the activity of CAT, SOD, GST and, in the NPSH and carbonyl protein levels. For cypermethrin there was hormetic effect for AChE activity. Inhibition of BChE and CAT and increase of SOD and GST occurred. To fipronil, there was inhibition of AChE, BChE and SOD, and increase of CAT and GST. Carbonyl protein levels increased for cypermethrin and fipronil. In this study *P. gracilis* was sensitive to concentrations that are environmentally relevant or that can be found in its natural habitat. The three insecticides showed potential of neurotoxic effect and induction of oxidative stress for the species. The effects on biochemical biomarkers of *P. gracilis* indicate that it is possible to use them for the purpose of monitoring the toxicity of pesticides in amphibians and to prevent irreversible effects on their population and ecosystem.

Keywords: Amphibian. Insecticide. LC50. Malformations. Biochemical biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Fórmula estrutural do clorpirifós.....	33
Figura 2 - Indivíduo adulto de <i>Physalaemus gracilis</i> (A). Desova com menos de 24 horas de oviposição (B) e larva no estágio 25 de Gosner (C).....	35
Figura 3 - Mortalidade cumulativa (%) de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de clorpirifós durante o ensaio agudo.....	42
Figura 4 - Mortalidade cumulativa (%) de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de clorpirifós durante o ensaio crônico.	43
Figura 5 - Alterações observadas na atividade natatória de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas à formulação comercial de clorpirifós (11-500 µg.L ⁻¹) em 168 horas, sendo (A) a porcentagem de larvas com espasmos e (B) com mobilidade reduzida.	44
Figura 6 - Malformação na boca de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a clorpirifós por 168 horas. Boca de uma larva do controle negativo (A). Boca de larva exposta a concentração de 250 µg.L ⁻¹ e 500 µg.L ⁻¹ (B e C).	45
Figura 7 - Malformação no intestino de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a clorpirifós por 168 horas. Intestino de uma larva do controle negativo (A) e intestino após a exposição a concentração de 250 µg.L ⁻¹ (B).	45
Figura 8 - Atividade das enzimas AChE (A) e BChE (B) em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de clorpirifós. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.	46
Figura 9 - Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), GST (C) e níveis de tiois não proteicos (D) em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de clorpirifós. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.	47
Figura 10 - Níveis de proteína carbonil (A) e TBARS (B) em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de clorpirifós. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.	48

CAPÍTULO II

Figura 1 - Fórmula estrutural da cipermetrina.....	66
Figura 2 - Fórmula estrutural do fipronil.....	68
Figura 3 - Mortalidade cumulativa (%) de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina (A) e fipronil (B) durante o ensaio crônico.....	75
Figura 4 - Atividade da enzima AChE em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	76

Figura 5 - Atividade da enzima BChE em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após exposição de 168 horas a cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	76
Figura 6 - Atividade da enzima SOD em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	77
Figura 7 - Atividade da enzima CAT em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	77
Figura 8 - Atividade da enzima GST em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	78
Figura 9 - Níveis de tiois não proteicos (NPSH) em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	78
Figura 10 - Níveis de proteína carbonil em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	79
Figura 11 - Níveis de TBARS em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.....	79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Mortalidade das larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a formulação comercial de clorpirifós (250-2000 µg.L ⁻¹) ao longo de 96 horas (teste agudo).	42
Tabela 2 - Mortalidade das larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a concentrações subletais da formulação comercial de clorpirifós (11-500 µg.L ⁻¹) ao longo de 168 horas (teste crônico).	43
Tabela 3 - Anormalidades morfológicas observadas em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a formulação comercial de clorpirifós (11-500 µg.L ⁻¹) após 168 horas.	45
Tabela 4 - Avaliação de risco ecológico para larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a clorpirifós.	48

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Mortalidade das larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostas a concentrações subletais da formulação comercial de cipermetrina (CIP) (1-20 µg.L ⁻¹) e fipronil (FIP) (26 – 1500 µg.L ⁻¹) ao longo de 168 horas.	74
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCH – Ascorbato

ATP - AdenosinaTrifosfato

BChE - Butirilcolinesterase

CAT - Catalase

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

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNPH - 2,4-dinitrofenil-hidrazina

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

EROs - Espécies reativas ao oxigênio

EC – Concentrado emulsionável

GPx - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GST - Glutathione S-transferase

GABA - Ácido gama-aminobutírico

HCl – Ácido clorídrico

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

i.a. – Ingrediente ativo

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

LOC (*Level of concern*) – Nível de preocupação

LPO – Peroxidação lipídica

MDA - Malondialdeído

NaOH - Hidróxido de sódio

NPSH - Tíol não-proteico

O₂ – Oxigênio molecular

O₂⁻ - Ânion superóxido

OH⁻ - Radical hidroxila

pH - Potencial hidrogeniônico

RCN - Receptores colinérgicos nicotínicos

SC – Suspensão concentrada

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

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO I.....	30
1 INTRODUÇÃO	32
2 METODOLOGIA	34
2.1 AGROTÓXICO.....	34
2.2 ORGANISMO-TESTE.....	35
2.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
2.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES	37
2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
2.4.2. ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)	37
2.4.3. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)	38
2.4.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	38
2.4.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	38
2.4.6 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	38
2.4.7 NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS	39
2.4.8 NÍVEIS DE PROTEÍNA CARBONIL.....	39
2.4.9 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	40
2.4.10 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA.....	40
2.5 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO	40
2.6 ANÁLISE DOS DADOS	41
3. RESULTADOS	41
3.1 TOXICIDADE AGUDA.....	41
3.2 TOXICIDADE CRÔNICA.....	42
3.2.1 MORTALIDADE	42
3.2.2. ATIVIDADE NATATÓRIA.....	43
3.2.3 MALFORMAÇÕES.....	44
3.2.3 BIOMARCADORES	45
3.2.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO	48
4 DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÃO	53

REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO II.....	62
1 INTRODUÇÃO	64
2 METODOLOGIA	67
2.1 AGROTÓXICO	67
2.2 ORGANISMO-TESTE	68
2.3 DESENHO EXPERIMENTAL	69
2.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	70
2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	70
2.4.2. ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	70
2.4.3. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)	70
2.4.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	71
2.4.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	71
2.4.6 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)	71
2.4.7 NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS	71
2.4.8 NÍVEIS DE PROTEÍNA CARBONIL	72
2.4.9 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	72
2.4.10 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA	73
2.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	73
3 RESULTADOS	73
3.1 TOXICIDADE CRÔNICA.....	73
3.1.1 MORTALIDADE	73
3.1.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	75
4 DISCUSSÃO	80
5 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada da seguinte forma: primeiramente está apresentada a introdução geral, que contempla um breve referencial teórico e, as referências bibliográficas utilizadas. Na sequência encontra-se a descrição do objetivo geral e objetivos específicos deste estudo. Os resultados, discussão e conclusão encontram-se na forma de artigo científico, com as respectivas referências, compreendendo dois capítulos:

- I. Capítulo I intitulado como “Alterações morfológicas, bioquímicas e mortalidade em larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) expostas ao inseticida clorpirifós”.
- II. Capítulo II intitulado como “Alterações bioquímicas em larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a concentrações subletais dos inseticidas cipermetrina e fipronil”.

Por fim, estão descritas as considerações finais referentes aos dois capítulos.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização acentuada de agrotóxicos na agricultura vem sendo uma crescente preocupação em países em desenvolvimento devido à poluição não pontual de diferentes compartimentos ambientais (LOCKE *et al.*, 2002; CORREIA *et al.*, 2010; VASCONCELOS, 2014; LAI, 2017). O Brasil é considerado um país em desenvolvimento e o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (MMA, 2018). Somente em 2017, a área agrícola correspondeu a 793.876,68 hectares (IBGE, 2018) sendo vendidas 53.9944,94 toneladas de ingrediente ativo no país e destas, 63.696,53 toneladas no estado do Rio Grande do Sul (IBAMA, 2018).

A expansão agrícola em conjunto com o uso crescente de agrotóxicos contribui para que o ambiente aquático seja um dos mais afetados (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; NAQVI; SHOAIB; ALI, 2016). Agrotóxicos podem se distribuir no ambiente por lixiviação, escoamento superficial e volatilização (BICALHO *et al.*, 2010; MMA, 2018) e ser responsáveis por diversos impactos ambientais, uma vez que eliminam determinados organismos, modificando o meio natural e causando alterações no funcionamento de ecossistemas (SPADOTTO *et al.*, 2004; KARANASIOS *et al.*, 2012; BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2015). Frequentemente organismos não-alvo são afetados por agrotóxicos devido a características fisiológicas e bioquímicas semelhantes com as de organismos alvo (KÖLER; TRIEBSKORN, 2013).

Inseticidas são agrotóxicos utilizados para o combate de muitos tipos de insetos e podem ser encontrados em águas superficiais (STEHLER; SCHULZ, 2016). Dentre as classes amplamente utilizadas destacam-se os organofosforados, piretróides e n-fenilpirazóis (IBAMA, 2018). As três classes afetam o sistema nervoso central dos insetos, sendo que os organofosforados inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) (KING; AARON, 2015), os piretróides atuam como moduladores dos canais de sódio (SODERLUND *et al.*, 2002; BRADBURY *et al.*, 2008) e os n-fenilpirazóis atuam como inibidores não-competitivos do receptor GABA associado a canais de cloro (MARTINS, 2009; ROBERTS; REIGART, 2013).

Anfíbios são animais vertebrados tetrápodes, que habitam diversos ambientes com ou sem presença de água e a probabilidade de entrarem em contato direto com agrotóxicos em seu habitat é alta (SEMLITSCH *et al.*, 1988; BRANDÃO *et al.*, 2011; WRUBLESWKI *et al.*, 2018). Possuem características que os classificam como excelentes bioindicadores como baixa taxa de deslocamento, adaptam-se facilmente ao stress ambiental, possuem resistência relativa a fatores abióticos como alterações de pH e pouca concentração de oxigênio. Na primeira fase do ciclo de vida, respiram por brânquias e permanecem na água (larvas ou girinos), alimentando-se por meio da coluna d'água (SEMLITSCH *et al.*, 1988). Sua fisiologia é bastante conhecida, podem ser considerados abundantes e fáceis para coletar. Tidos como monitores ambientais, eles podem ser localizados em vários ambientes com água, inclusive em poças temporárias ou pequenas (HARTMANN *et al.*, 2010).

A grande maioria habita em sistemas lênticos e enquadram-se como um dos grupos que sofreu a maior taxa de extinção recentemente (HOULAHAN *et al.*, 2000; STUART *et al.*, 2004; IUCN, 2018). Dentre as intervenções antrópicas que colaboram para elevação desta taxa destacam-se o emprego de contaminantes como agrotóxicos (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; JOHNSON *et al.*, 2013) doenças, espécies invasoras e modificações de habitat (WAKE; VREDENBURG, 2008; HOSKINS; BOONE, 2017).

No mundo há 7940 espécies de anfíbios, sendo 7008 espécies da ordem Anura (FROST, 2018). A última avaliação realizada em 2008 pela *International Union for Conservation of Nature (IUCN)*, mostrou que para a ordem Anura, 32,4% das espécies estão ameaçadas ou extintas globalmente (IUCN, 2018). No Brasil, até julho de 2016 foram identificadas 1080 espécies de anfíbios (1039 de Anura, 5 de Caudata e 36 de Gymnophinia) (SEGALLA *et al.*, 2016). Entre 2010 e 2014, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através da Portaria nº 445 de 17 de dezembro de 2014 realizou uma avaliação do risco de extinção para todos os vertebrados descritos no Brasil, incluindo 973 anfíbios, dos quais, 41 estão ameaçados de extinção (BRASIL, 2014).

Embora um dos motivos do declínio dos anfíbios possa ser contaminação por xenobióticos (DAVID *et al.*, 2012; LAVORATO *et al.*, 2013), estudos sobre os efeitos crônicos de agrotóxicos em populações de anfíbios ainda são escassos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MACAGNAN *et al.*, 2017), apesar de serem importantes para descoberta de espécies indicadoras de alterações ambientais (STUART *et al.*, 2004; GONÇALVES, 2015). No Brasil, isto é mais alarmante, pois tem a maior biodiversidade de anuros do mundo (SEGALLA *et al.*, 2016), contendo em torno de 17% da diversidade global, e a maior quantidade de espécies endêmicas do mundo (FROST, 2018).

Em geral, o desenvolvimento dos anfíbios anuros é caracterizado por estágios que variam de 1 a 46, sendo conhecidos como estágios de Gosner (GOSNER, 1960). O primeiro estágio, de 1 a 20, é denominado fase embrionária e é nesse período que os indivíduos encontram-se protegidos por uma camada gelatinosa, isto é, estão dentro do ovo (MCDIARMMID; ALTIG, 1999). Após, ocorre a fase “*hatchling*”, composta pelos organismos jovens que eclodiram do ovo, iniciando no estágio 21 e encerrando no estágio 24. Do estágio 25 ao 41 ocorre a fase larval, que é o maior período de desenvolvimento devido ao crescimento dos membros necessários a transição da fase aquática para a terrestre (MCDIARMMID; ALTIG, 1999). A última etapa é a fase de metamorfose, a qual começa no estágio 42 e termina no estágio 46, onde tem-se os indivíduos adultos (MCDIARMMID; ALTIG, 1999).

Os estágios de 20 a 25 correspondem a transição da fase embrionária para larva (girino), neste período os indivíduos desenvolvem as estruturas para alimentação, respiração e natação, como boca, brânquias e cauda, além da pigmentação da pele (MCDIARMMID; ALTIG, 1999). Na passagem da fase embrionária para larva (girino), a larva assemelha-se a um peixe (DUELLMAN; TRUEB, 1994). As larvas respiram através de brânquias, alimentam-se de partículas suspensas na água ou raspam alimentos no ambiente onde se encontram (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Como possuem hábitos alimentares específicos, necessitam de peças bucais e sistema digestivo diferente dos indivíduos adultos (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Além disso, contém uma cauda e barbatanas que auxiliam na natação, ao contrário dos adultos (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

O gênero do anfíbio *Physalaemus* é um dos gêneros da família Leptodactylidae (LOURENÇO *et al.*, 2015). Atualmente distribui-se pela região norte e central da Argentina; Bolívia oriental; Paraguai; Uruguai; Brasil e as Guianas; terras baixas do sul da Venezuela e Llanos do sudeste da Colômbia, possuindo 47 espécies reconhecidas (FROST, 2018). Dentre as espécies de anuros com ocorrência no Brasil, tem-se a de *Physalaemus gracilis*, classificada como menos preocupante na lista vermelha da IUCN devido a sua elevada distribuição e tolerância em diversos habitats, logo até o momento não possui risco de extinção (LAVILLA *et al.*, 2010; IUCN, 2018). Também conhecida como rã – chorona, a espécie é encontrada no Uruguai, Argentina e Brasil (FROST, 2018), neste caso, nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (HERPETOLOGIA UFRGS, 2010). Os indivíduos adultos são pequenos, com tamanho entre 2,7 e 3,2 cm e, com coloração variando desde castanho avermelhado até cinza claro (ZANK *et al.*, 2014; BORGES-MARTINS *et al.*, 2007). Para reprodução, a espécie forma ninhos de espuma, onde deposita os ovos (LINGNAU, 2009), em ambientes lênticos (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007). Também, pode produzir os ninhos em áreas úmidas temporárias, áreas abertas e bordas de lagoas permanentes com vegetação (LINGNAU, 2009).

Anfíbios são um grupo de organismo-teste que podem ser utilizados em ensaios de toxicidade com agrotóxicos (JAYAWARDENA *et al.*, 2010; VASCONCELOS, 2014; MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018). Estudos mostram que a exposição aos agrotóxicos resulta em redução da sobrevivência, maior tempo para desenvolvimento, modificações de comportamento e deformações (LAJMANOVICH *et al.*, 2014; MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018), deixando-os mais vulneráveis a predadores e com capacidade reprodutiva reduzida (JAYAWARDENA *et al.*, 2010).

Para avaliação de efeitos toxicológicos podem ser utilizados marcadores bioquímicos que detectam as primeiras alterações biológicas e tem como função evitar que os efeitos da exposição a xenobióticos alcancem níveis irreversíveis no organismo (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Essas alterações podem ocorrer a nível celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, sendo possível a mensuração em células, fluidos corporais, tecidos e órgãos (VAN

DER OOST *et al.*, 2003; LAM, 2009). Dentre os biomarcadores mais utilizados destacam-se enzimas envolvidas na metabolização de compostos tóxicos e marcadores de danos oxidativos (BURGEOT *et al.*, 1996; MODESTO, 2009).

Os organismos possuem mecanismos de proteção das células para garantir sua sobrevivência ao serem expostos a substâncias tóxicas (DE SMET; BLUST, 2001; VILÉLA, 2007; OSSANA *et al.*, 2013). Estes mecanismos consistem na absorção, distribuição, biotransformação e eliminação (VILÉLA, 2007). A alimentação e transporte direto por meio de membranas externas são uma das rotas de absorção de xenobióticos e posterior distribuição no corpo dos organismos (VILÉLA, 2007). As principais formas de eliminação do contaminante pelo organismo são a excreção do xenobiótico de forma natural ou a biotransformação, onde tem-se a produção de compostos hidrofílicos que podem ser eliminados com maior facilidade (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Como boa parte dos contaminantes tem propriedade lipofílica e alta capacidade de permear as membranas biológicas, eles podem danificar componentes celulares e resistirem aos processos de biotransformação e eliminação, acumulando-se em organismos (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Durante o funcionamento normal das células, em diferentes organismos vivos, ocorre a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que consistem em radicais livres ou moléculas reativas instáveis geradas em processos de oxidações biológicas (AHMAD *et al.* 2000; FERREIRA *et al.*, 2010). As EROs são resultantes da ativação ou redução de oxigênio molecular (O_2) e dividem-se em ânion radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (AHMAD *et al.*, 2000; VAN DER OOST *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2015). Durante a biotransformação de poluentes em organismos aquáticos pode ocorrer dano oxidativo em função de 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 podem causar danos ao organismo quando há um aumento demasiado na sua produção ou inibição de agentes antioxidantes, resultante tanto de fatores externos quanto internos (STEGEMAN *et al.*, 1992; AHMAD *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2010). Os prejuízos causados pelo excesso de

EROs são danos oxidativos as macromoléculas, peroxidação de lipídios da membrana e danos no funcionamento da atividade das enzimas, podendo ocorrer também oxidação de proteínas (FALFUSHINSKA *et al.*, 2008; CLASEN *et al.*, 2012; 2018). O ataque a proteínas pode resultar em alterações nos resíduos de aminoácidos, clivagem de ligações peptídicas, oxidação dos grupos sulfidríla, reações com lipídios e com produtos formados na oxidação de carboidratos e formação de proteína carbonil (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006; BIRBEN *et al.*, 2012).

Na peroxidação lipídica ocorrem danos na camada lipídica das membranas celulares, que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, o que interfere na fluidez e estrutura da membrana (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; TONI *et al.*, 2011). Durante a peroxidação lipídica o principal produto formado é o malondialdeído (MDA), resultante da degradação enzimática de ácidos graxos poliinsaturados e representado pelo nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Níveis elevados de MDA ocasionam maior formação de lipoperóxidos e indicam maior peroxidação lipídica (LUSHCHAK; BAGNYUKONA, 2006).

Todos os organismos aeróbios possuem mecanismos antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos que auxiliam na defesa contra os danos oxidativos (ZHANG *et al.*, 2005; TRENZADO *et al.*, 2006). Como principais enzimas antioxidantes tem-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (NOCTOR; FOYER, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2007; OSSANA *et al.*, 2013). A SOD é uma das enzimas antioxidantes mais importantes, é a primeira a atuar na defesa da célula contra as EROs, catalisando a reação do ânion superóxido (O_2^-) em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente, a CAT degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (H_2O e O_2 , respectivamente) (MARAN *et al.*, 2009; MODESTO; MARTINEZ, 2010). A CAT e a GPx desempenham funções complementares na degradação do peróxido de hidrogênio, porém, a CAT é mais eficiente do que as glutathionas (enzimas antioxidantes) em elevadas concentrações de H_2O_2 (KINNULA, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; RAHMAN *et al.*, 2006).

Os tióis não proteicos (NPSH) também possuem capacidade antioxidante e atuam contra a formação de radicais livres e na manutenção do balanço redox na célula (REISCHL *et al.*, 2007). A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não proteico mais abundante em células animais (OROPESA *et al.*, 2009) e está envolvido em vários processos biológicos como síntese de DNA e proteínas (MENEZES *et al.*, 2016). Além disso, consiste em um antioxidante não enzimático que desempenha função de radical ou substrato para enzimas, auxiliando na transformação de xenobióticos (HERMES-LIMA, 2004; MARAN *et al.*, 2009; MODESTO; MARTINEZ, 2010).

A enzima Glutathiona-S-Transferase (GST) composta por três famílias de enzimas (citossólica, mitocondrial e microsossomal) (ZHANG *et al.*, 2005) necessita do cofator GSH para atuar, pois, catalisa a conjugação de vários toxicantes com a GSH, protegendo os lipídios da peroxidação durante a desintoxicação, tornando os xenobióticos mais facilmente excretáveis (CAIRRÃO *et al.*, 2004; MODESTO; MARTINEZ, 2010). Um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST pode indicar que o organismo exposto ao toxicante exerceu efeito protetor contra EROS que podem causar dano oxidativo (SOTOMAYOR *et al.*, 2015; PELTZER *et al.*, 2013).

A detoxificação de xenobióticos também pode ocorrer pela ação de enzimas colinesterases que desempenham funções importantes na neurotransmissão colinérgica no sistema nervoso central e periférico, bem como na hidrólise de ésteres de colina (BRETAUD *et al.*, 2000; ROEX *et al.*, 2003). As colinesterases dividem-se em acetilcolinesterase (AChE) presente no sistema nervoso central, periférico parassimpático e junção neuromuscular, bem como na superfície de eritrócitos e, em butirilcolinesterase (BChE) contida em todos os tecidos, no plasma e no fígado onde auxilia na transformação e eliminação de xenobióticos (KING; AARON, 2015). Agrotóxicos da classe dos inseticidas geralmente causam inibição das colinesterases em vertebrados (ROBERTS; REIGART, 2013). No caso da AChE, que é responsável pela finalização do impulso nervoso, quando sua atividade é inibida, acetilcolina acumula-se nas fendas sinápticas podendo causar distúrbios locomotores,

musculares, espasmos (MANN *et al.*, 2009), interferir também na alimentação, na reprodução e provocar mortalidade (MIRON *et al.*, 2005).

Considerando o exposto, estudos utilizando anfíbios como bioindicadores de toxicidade por agrotóxicos são relevantes para entender como poluentes ambientais podem interferir no ciclo de vida e influenciar nos processos de extinção destes vertebrados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade letal e subletal de uma formulação comercial a base de clorpirifós e, a toxicidade subletal de uma formulação a base de cipermetrina e outra de fipronil em larvas de *P. gracilis*.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração letal média (CL₅₀) da formulação comercial de clorpirifós em larvas de *P. gracilis*.
- Verificar a presença de alterações na atividade natatória e anomalias morfológicas após a exposição subletal a clorpirifós.
- Determinar para as larvas expostas a clorpirifós, a concentração de efeito observado (CEO) e não observado (CENO), calcular a máxima concentração aceitável do toxicante e o risco ecológico agudo e crônico para a mortalidade, atividade natatória e anomalias morfológicas.
- Avaliar a toxicidade de clorpirifós, cipermetrina e fipronil nos biomarcadores bioquímicos AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, TBARS e proteína carbonil.

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 effluente 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 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.
- ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.; JUNGES, C. M.; LORENZATTI, E.; ARÓ, C.; GRENÓN, P. Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura : Hylidae) exposed to chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 287–294, 2015.
- BEEBEE, T. J.C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, n. 3, p.271-285, 2005.
- BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 174-183, 2015.
- BICALHO, S.T. T.; LANGENBACH, T.; RODRIGUES, R. R.; CORREIA, F. V.; HAGLER, A. N.; MATALLO, M. B.; LUCHINI, L. C. Herbicide distribution in soils of a riparian forest and neighboring sugar cane field. **Geoderma**, v. 158, p. 392 - 397, 2010.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n.1, p. 9–19, 2012.
- BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (Org.) **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazaís de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007, p. 387.
- BRADBURY, S. P; CARLSON, R. W.; HENRY, T. R.; PADILLA, S.; COWDEN. J. **Toxic responses of the fish nervous system**. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E.; (Ed.). *The Toxicology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor, 2008. P. 417-456.
- BRANDÃO, F. P.; MARQUES, S.; RODRIGUES, S.; SANTOS, B.; TRAVASSO, R.; VENÂNCIO, C.; PEREIRA, R.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M.; SOARES, A. M. V. M.; GONÇALVES, F.; LOPES, I. Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi*. **Captar**, v. 3, p. 66–77, 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014**. Disponível em:
<http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2014/p_mma_445_

2014_lista_peixes_amea%C3%A7ados_extin%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2018.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuran, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.

BURGEOT, T.; BOCQUENÉ, G.; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.M.; GARCIA DE LA PARRA, L.M.; PFHOL-LESZKOWICS, A.; RAOUX, C.; GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**. v. 131, p. 125-141, 1996

CAIRRÃO, E.; COUDERCHET, M.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L. Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 4; p. 277-286, 2004.

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.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; MURUSSI, C.R.; TIECHER, T. L.; MORAES, B.; ZANELLA, R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 737-743, 2018.

COLLINS, J. P.; CRUMP, M. L. **Extinction in our times**. New York: Oxford University Press. 304 p. 2009.

CORREIA, F. V.; LANGENBACH, T.; CAMPOS, T. M. Avaliação do transporte de atrazina em solos sob diferentes condições de manejo agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 2, 2010.

DAVID, M. SHAMBANAGOUDA, R. M.; VUMAR, K. P.; RAMESH, H. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicator of sublethal cypermethrin intoxication on tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 127-134, 2012.

DE SMET, H.; BLUST, R. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 48, p. 255-262, 2001.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L.; **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill, 1994.

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, p. 223-229, 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, D. **Parâmetros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a agroquímicos**. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria - RS. 2010.

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.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 28 nov.2018.

GONÇALVES, M. W. **Alterações genômicas e mutagênicas em duas espécies de anfíbios anuros**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

GOSNER K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n.3, p. 183-189, 1960.

HARTMANN, M. T.; HARTMANN, P. A.; HADDAD, C. F. B. Reproductive modes and fecundity of an assemblage of anuran amphibians in the Atlantic rainforest, Brazil. **Iheringia**, v. 100, n. 3, p. 207 - 215. 2010.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in Biology and Biochemistry**. In: STOREY, K.B. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, 2004, p. 319-368, 2004.

HERPETOLOGIA UFRGS. **Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/herpetologia>>. Acesso em: 10 abr.2018.

HOSKINS, T. D.; BOONE, M. D. Variation in malathion sensitivity among populations of Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*) and implications for risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1917-1923, 2017.

HOULAHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; SCHMIDT, B. R.; MEYER, A. H.; KUZMIN, S. L. Quantitative evidence for global amphibian declines. **Nature**, v. 404, p. 752 - 755, 2000.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. 2018. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 16 dezembro. 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático de produção agrícola**. 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em: 22 set. 2018.

IUCN - International Union for Conservation of Nature **Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 15 maio 2018.

- JACKSON, L. W.; SCHISTERMAN, E. F.; DEY-RAO, R.; BROWNE, R.; ARMSTRONG, D. Oxidative stress and endometriosis. **Human Reproduction**, v. 20, p. 2014-2020, 2005.
- JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, SP**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.
- JAYAWARDENA, U. A.; RAJAKARUNA, R. S.; NAVARATNE, A. N.; AMERASINGHE, P.H. Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 12, n. 5, 2010.
- JIN, Y.; LIU, Z.; PENG, T.; FU, Z. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, p. 405–414, 2015.
- JOHNSON, L. A.; WELCH, B.; WHITFIELD, S. M. Interactive effects of pesticide mixtures, predators, and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to redeyed tree frog larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 10, p.2379-2386, 2013.
- KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS, N.G.; KARPOUZAS, D.G. On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: Recent biotechnological advances and future perspectives. **Biodegradation**, v. 23, p. 787–802, 2012.
- KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, p. 133–151, 2015.
- KINNULA, V.L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway disease. **Thorax**, v.60, p.693-700, 2005.
- KÖLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.
- LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKUSEN, M. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, M.; PELTZER, P. M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with glifosinate –ammonium. **Mutation Research**, v. 769, p. 7-12, 2014.
- LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348-354, 2009.
- LEITE, P. Z.; MARGARIDO, T. C. S.; DE LIMA, D.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n.8, p.1411-1421, 2010.
- LAVILLA, E.; KWET, A.; SEGALLA, M. V.; LANGONE, J.; BALDO, D. ***Physalaemus gracilis***. The IUCN red list of threatened Species, 2010. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/57258/0>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

LAVORATO, M.; BERNABÒ, I.; CRESCENTE, A.; DENOËL, M.; TRIPEPI, S.; BRUNELLI, E. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 253-262, 2013.

LAI, W. Pesticide use and health outcomes: Evidence from agricultural water pollution in China. **Journal of Environmental Economics and Management**, China, v. 86, p. 93-120, 2017.

LI, B.; MA, Y.; ZHANG, Y. H. Oxidative stress and hepatotoxicity in the frog, *Rana chensinensis*, when exposed to low doses of trichlorfon. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 7, p. 476-482, 2017.

LINGNAU, R. **Distribuição temporal, atividade reprodutiva e vocalizações em uma assembleia de anfíbios anuros de uma floresta ombrófila mista em Santa Catarina, sul do Brasil**. 2009. 103 f. Tese de Doutorado – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

LOCKE, M. A.; ZABLOTOWICZ, R. M.; STEINRIEDE, R. W.; DABNEY, S. M. Conservation management practices in Mississippi delta agriculture: Implications for crop production and environmental quality. In: VAN SANTEN, E. ed. Making conservation tillage conventional: Building a future on 25 years of research. In: **Annual southern conservation tillage conference for sustainable agriculture**, Auburn, 2002.

LOURENÇO, L. B.; TARGUETA, C. P.; BALDO, D.; NASCIMENTO, J.; GARCIA, P. C. A.; ANDRADE, G.V.; HADDAD, C. F. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 204-216, 2015.

LUSHCHAK, V.; BAGNYUKONA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 283-289, 2006.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; MACAGNAN, L. P.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20699-20704, 2017.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 22 set. 2018.

MANN, R.M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C.B.; WILSON, S.P. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p.2903-2927, 2009.

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.

MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. **Tapdoles: the biology of anuran larvae**. Roy: Chicago, 1999.

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.

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

MODESTO, K. A. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. 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.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper - bioquímica ilustrada**. 27 ed. Editora: McGraw Hill, 2007.

NAQVI, G.; SHOAIB, N.; ALI, A. M. Genotoxic potential of pesticides in the peripheral blood erythrocytes of fish (*Oreochromis mossambicus*). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 48, n. 6, p. 1643-1648, 2016.

NIGG, H. N.; KNAAK, J. B. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p.29–111, 2000.

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

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**.3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, M. C. L. M; SANTOS, M. B; LOEBMANN, D; HARTMAN, A.; TOZETTI, A. M. Diversity and associations between coastal habitats and Anurans in southern-most Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 85, p. 575–583, 2013.

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, 2013.

PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; REPETTI, M. R.; SIGRIST, M. E.; BELDOMÉNICO, H. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 142–151, 2013.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n.1-3, p.222-239, 2006.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere, 1995, 666 p.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM-FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 22-53, 2007

ROBERTS, J. R.; REIGART, J. R. **Recognition and management of pesticides poisonings**. EPA: Washington, 2013.

ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C. A. M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 451-460, 2003.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Lethal and sublethal effects of the herbicide atrazine in the early stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 587-593, 2018.

SANTOS, T. G.; MELO, R.; COSTA-SILVA, D. G.; NUNES, M. E. M.; RODRIGUES, N. R.; FRANCO, J. L. Assessment of water pollution in the Brazilian Pampa biome by means of stress biomarkers in tadpoles of the leaf frog *Phyllomedusa iheringii* (Anura: Hylidae). **Peer J**, v. 9, 2015.

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: Mudanças Taxonômicas**, v. 5, n. 2, p.34-46, 2016.

SEMLITSCH, R. D.; SCOTT, D. E.; PECHMANN, J. H. K. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. **Ecology**, v. 69, n. 1, p.184 - 192, 1988.

SEMLITSCH, R. D. Introduction: General threats to amphibians. In: **Amphibian Conservation**. Smithsonian books Washington and London, p. 1 - 7, 2003.

SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T. B.; JOHNSON, C. A.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, p. 1072–1077, 2006.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.

SOTOMAYOR, V.; CHIRIOTTO, T.S.; PECHEN, A.M.; VENTURINO, A. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 119, p.48-53, mar. 2015

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. In: **Embrapa Meio Ambiente**, São Paulo, 2004.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.J.; FORLIN, L.; FOWLER, B.M.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P. **Molecular responder to environmental contaminations**: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M. Jr.; BERGMAN, H.L. (eds.), Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological markers of Anthropogenic Stress. Lewis publisher, MI, USA: p.253-336, 1992.

STEHLÉ, S.; SCHULZ, R. Global Insecticide Surface Water Contamination Assessment: BECT's Contribution in the Last Five Decades. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 5, p.563-564, 2016.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E; RODRIGUES; A. S. L.; FISCHMAN, L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783–1786, 2004.

TONI, C.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; CLASEN, B.E.; CATTANEO, R.; SANTI, A.; PRETTO, A.; ZANELLA, R.; LEITEMPERGER, J. 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.

TRENZADO, C.; HIDALGO, C. M.; GARCÍA-GALLEGO, M.; MORALES, A. E.; FURNÉ, M.; DOMEZAIN, A.; DOMEZAIN, J.; SANZ, A. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*: A comparative study. **Aquaculture**, v. 254, p. 758-767, 2006.

ÜNER, N.; ORUÇ, E. O.; SEVGILER, Y.; SAHIN, N.; DURMAZ, H.; USTA, D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 241–245, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

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.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2014.

VILÉLA, M. B. F. A. **Estresse oxidativo em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo**. 2007. 59 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11466-11473, 2008.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 137–161, 1991.

ZANK, C.; ANÉS, A. C.; COLOMBO, P.; MARTINS, M. B. **Anfíbios**. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/269697878_Anfibios>. Acesso em: 2 outubro 2018.

ZHANG, J.F.; LIU, H.; SUN, Y. Y.; WANG, X. R.; WU, J. C.; XUE, Y. Q. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n.1, p. 185-190, 2005.

CAPÍTULO I

Alterações morfológicas, bioquímicas e mortalidade em larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) expostas ao inseticida clorpirifós

RESUMO

Inseticidas organofosforados são comumente os mais detectados em águas superficiais de todo o mundo, inclusive no Brasil. São considerados altamente tóxicos para anfíbios além de apresentar toxicidade para insetos, aves e mamíferos. *Physalaemus gracilis* é um anfíbio que utiliza como sítios reprodutivos fontes de água localizadas próximas a áreas agrícolas onde o inseticida clorpirifós é aplicado. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito letal e subletal de clorpirifós em larvas de *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). O agrotóxico utilizado no ensaio de toxicidade aguda e crônica foi a formulação comercial Klorpan 480 EC. As concentrações testadas no ensaio de toxicidade aguda variaram entre 750 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para o ensaio crônico foram escolhidas concentrações de clorpirifós consideradas ambientalmente relevantes entre 11 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Durante o ensaio crônico foi observada a mortalidade, atividade natatória e ao final, as larvas foram comparadas ao controle para verificar a presença de alterações morfológicas. Após, foram congeladas para as análises dos biomarcadores bioquímicos: AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, proteína carbonil e TBARS. A CL_{50} de clorpirifós para larvas de *P. gracilis* foi de 893,59 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em todas as concentrações testadas as larvas apresentaram mobilidade reduzida e espasmos. Foram encontradas anomalias morfológicas na boca e no intestino. Houve redução na atividade da AChE nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para BChE não foi observado efeito nas concentrações avaliadas. Ocorreu aumento na atividade da CAT em todas as concentrações, SOD a partir de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e, GST a partir de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Observou-se aumento nos níveis de NPSH a partir de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de proteína carbonil a partir de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para TBARS não foi registrada alteração nos níveis em qualquer concentração. O inseticida testado apresentou risco agudo e crônico para *P. gracilis* e causou efeitos neurotóxicos e dano oxidativo. Todos os efeitos observados nesse estudo são relevantes para a sobrevivência das larvas de *P. gracilis* em seu habitat natural.

Palavras-chave: Anfíbio. Organofosforado. CL_{50} . Neurotoxicidade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Organophosphate insecticides are commonly the most detected in surface waters around the world, including in Brazil. They are considered highly toxic to amphibians, insects, birds and mammals. *Physalaemus gracilis* is an amphibian that uses as reproductive sites water sources located near agricultural areas where the insecticide chlorpyrifos is applied. In this context, the aim of this study was to evaluate the lethal and sublethal effect of chlorpyrifos in larvae of *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). The agrochemical used in the acute and chronic toxicity test was the Klorpan 480 EC commercial formulation. The concentrations tested in the acute toxicity test were between 750 and 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. For the chronic assay, concentrations of chlorpyrifos considered environmentally relevant between 11 and 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ were chosen. During the chronic test, mortality, swimming activity were monitored and at the end, larvae were compared to the control to verify the presence of morphological alterations. Afterwards, they were frozen for analysis of biochemical biomarkers: AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, carbonyl protein and TBARS. The LC50 of chlorpyrifos for larvae of *P. gracilis* was 893.59 $\mu\text{g.L}^{-1}$. At all concentrations tested the larvae presented reduced mobility and spasms. Morphological abnormalities were found in the mouth and intestine. There was a reduction in AChE activity at concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and for BChE no effect was observed at the concentrations evaluated. There was an increase in CAT activity at all concentrations, SOD from 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and GST from 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$. There was an increase in NPSH levels from 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and carbonyl protein from 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$. TBARS levels were not changed at any concentration. The insecticide tested presented an acute and chronic risk for *P. gracilis* and caused neurotoxic effects and oxidative damage. All effects observed in this study are relevant for the survival of *P. gracilis* larvae in their natural habitat.

Keywords: Amphibian. Organophosphorus. LC50. Neurotoxicity. Oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura consiste em um dos mais importantes setores da economia mundial e com isso, a utilização de agrotóxicos é imprescindível para controlar pragas e aumentar a produção (LIZANO-FALLAS *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, os inseticidas organofosforados vêm sendo amplamente utilizados em diversas áreas da agricultura (GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2017). Apesar de terem sido desenvolvidos para atuarem seletivamente contra insetos, organofosforados podem afetar espécies não alvo, como vertebrados (KOYAMA, 1996; SENTHILKUMAR *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2014), sendo facilmente absorvidos e ingeridos, apresentando toxicidade para anfíbios, aves e mamíferos (ROBERTS; REIGART, 2013).

Os organofosforados são absorvidos por todas as vias e podem ser armazenados no tecido adiposo (KING; AARON, 2015). Devido a solubilidade em lipídios, atravessam facilmente as membranas biológicas e até a barreira hematoencefálica (ABOU-DONIA, 2003). Além disso, inibem as enzimas colinesterases, como a acetilcolinesterase (AChE) presente no sistema nervoso central, periférico parassimpático e junção neuromuscular, bem como na superfície de eritrócitos e, a butirilcolinesterase (BChE) contida em todos os tecidos, no plasma e no fígado onde auxilia na transformação e eliminação de xenobióticos (KING; AARON, 2015). A inibição das colinesterases pelo inseticida organofosforado ocorre devido a fosforilação da hidroxila do resíduo aminoácido serina (presente no sítio ativo) pelo grupo fosforil ($P=O$) dos organofosforados, impedindo que a enzima hidrolise o substrato acetilcolina (ABOU-DONIA, 2003). A estrutura química do organofosforado confere maior ou menor estabilidade na ligação que ocorre entre a enzima e o composto (COSTA, 2006). Geralmente a ligação fósforo-enzima é muito estável, podendo necessitar de horas ou dias para quebrar a ligação e impedindo que a enzima esteja disponível para realizar sua função (COSTA, 2006).

Um dos inseticidas organofosforados mais usados no Brasil é o clorpirifós (O,O-dietil O-3,5,6-trichloropiridin-2-yl fosforotioato), fórmula molecular $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (IBAMA, 2018) (Figura 1). Classifica-se como altamente tóxico (Classe II) e muito perigoso ao meio ambiente (PENA *et al.*, 2003), possuindo função de inseticida e acaricida (ANVISA, 2015). É empregado no controle de

moscas, lagartas, ácaros, pulgões e em culturas de milho, soja, feijão, café, algodão, maçã, batata, dentre outras (PENA *et al.*, 2003; ANVISA, 2015).

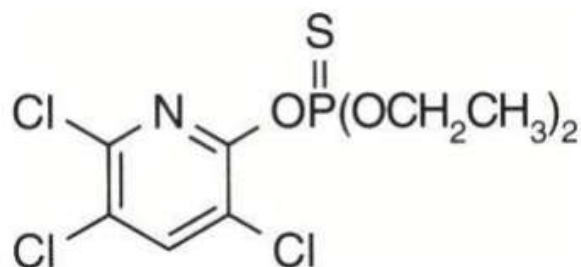


Figura 1 - Fórmula estrutural do clorpirifós. **Fonte:** ANVISA, 2015.

A elevada utilização de clorpirifós bem como o seu armazenamento e descarte inadequado são fontes de contaminação ambiental (UNIYAL; SHARMA, 2018). Os danos causados por determinado contaminante em organismos e em ecossistemas podem ser expressos através de ensaios de toxicidade aguda (letal) e crônica (subletal) (HARTMANN, 2004) e, os resultados desses ensaios servem de base (USEPA, 1992) para o cálculo da avaliação de risco ecológico (EVANS *et al.*, 2003). A função da avaliação de risco é diagnosticar efeitos ecológicos adversos devido a exposição a um ou mais estressores (USEPA, 1992) tendo como principal vantagem a eficiência e baixo custo de aplicabilidade para determinar situações de alto ou baixo risco (REBELO; CALDAS, 2014).

Durante a metabolização, o clorpirifós pode passar pelo processo de bioativação produzindo um metabólito mais tóxico denominado oxon ((CPF-O) que se liga irreversivelmente a AChE inativando-a (EATON *et al.*, 2008). Por outro lado, pode ser detoxificado gerando metabólitos não tóxicos (EATON *et al.*, 2008). Apesar desse inseticida ser considerado neurotóxico por atingir o sistema nervoso central (KI *et al.*, 2013; ATTADEMO *et al.*, 2015) também pode induzir dano oxidativo em outros organismos como anfíbios (COSTA *et al.* 2008; PELTZER *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2014; SOTOMAYOR *et al.*, 2015).

Anfíbios são animais sensíveis a poluição dos recursos hídricos, inclusive por agrotóxicos (PALENSKE *et al.*, 2010). Várias espécies reproduzem-se no interior ou ao redor de áreas agrícolas onde são empregados agrotóxicos e outros poluentes (PALENSKE *et al.*, 2010) e isto

pode ser uma das causas do declínio de populações (FELLERS *et al.*, 2004; HAYES *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2014). Os anfíbios possuem ciclo de vida bifásico, o que permite o contato com agrotóxicos tanto no ambiente aquático (embriões e larvas) quanto no ambiente terrestre quando adultos (PALENSKE *et al.*, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2011). Durante o estágio larval, os anfíbios são especialmente suscetíveis aos agrotóxicos devido a pele fina e permeável e respiração por brânquias, possibilitando o fluxo contínuo de água potencialmente contaminada (WIJESINGHE *et al.*, 2011).

Physalaemus gracilis (Anura: Leptodactylidae), popularmente conhecida como rã chorona, é uma espécie de anfíbio amplamente distribuída no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (FROST, 2018). A espécie é encontrada em fontes de água próximas a agroecossistemas (LAVILLA *et al.*, 2010) podendo ser um organismo vulnerável aos agrotóxicos.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de uma formulação comercial de clorpirifós na mortalidade, atividade natatória, morfologia e em biomarcadores bioquímicos de larvas de *P. gracilis*, além de avaliar o risco ecológico para alguns efeitos causados pelo clorpirifós nesse vertebrado não-alvo dos agrotóxicos.

2 METODOLOGIA

2.1 AGROTÓXICO

Foi utilizada a formulação comercial Klorpan 480 EC, contendo 480 g/L de ingrediente ativo (i. a.) clorpirifós, 495, 77 g/L de xilol e 79,34 g/L de outros ingredientes.

O tempo de meia vida de clorpirifós na água varia de 35 a 78 dias, em pH 7 e temperatura de 25°C (KAMRIN, 1997). Sua solubilidade em água a 20°C é de 0,73 mg/L, possui coeficiente de partição octanol-água igual a 5, pressão de vapor de $1,73 \times 10^{-5}$ torr a 25°C e constante da Lei de Henry de $1,10 \times 10^{-5}$ atm m³ mol⁻¹ (MACKAY *et al.*, 2014).

A solução-estoque foi obtida pela diluição da formulação comercial em água destilada (concentração de 500 mg.L⁻¹) realizada no dia do início dos ensaios agudo e crônico. As concentrações foram colocadas com micropipeta apenas uma vez no início dos ensaios.

2.2 ORGANISMO-TESTE

Desovas totais de *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae) (Figura 2) foram coletadas no lago da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - campus Erechim – RS (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste) com menos de 24 horas de oviposição.



Figura 2 - Indivíduo adulto de *Physalaemus gracilis* (A). Desova com menos de 24 horas de oviposição (B) e larva no estágio 25 de Gosner (C). **Fonte:** (A) Gilcineia dos Santos, (B) a autora e (C) Natani Macagnan.

No laboratório, as desovas foram dispostas em aquários de 15 litros, em água de poço artesiano livre de cloro (analisada previamente e atendendo os padrões de potabilidade), em condições controladas de laboratório. Os parâmetros da água usada nos aquários dos grupos controle e tratamentos foram: 24°C (± 1); pH de 7,0 ($\pm 0,5$), oxigênio dissolvido de 5 (± 1) mg.L⁻¹, turbidez < 5, condutividade de 160 (± 10) μ S/cm, alcalinidade de 9,74 mgCaCO₃.L⁻¹, sódio de 44,1 mg.L⁻¹, magnésio de 1,35 mg.L⁻¹, ferro de 0,08 mg.L⁻¹ e níquel menor de 0,001mg/L. A sala foi aclimatada com a temperatura entre 25°C (± 2) e com umidade relativa do ar entre 60 e 80% além de iluminação controlada (12/12 horas claro-escuro). Os indivíduos foram alimentados no ensaio agudo e crônico com ração comercial para peixes (Alcon Basic) vegetal, em flocos e com 45% de proteína bruta. Animais excedentes foram devolvidos a natureza, no mesmo local de coleta das desovas.

Para realização deste estudo, obteve-se licença do ICMBio nº 54939-1 e autorização do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (23205.003635/2017-14).

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ensaios de toxicidade iniciaram quando as larvas atingiram o estágio de desenvolvimento 25 de Gosner (1960). Para a determinação da concentração letal média (CL_{50}) foi realizado o ensaio de toxicidade aguda por 96 horas (4 dias, ensaio estático). Para a determinação dos efeitos subletais realizou-se o ensaio de toxicidade crônica curto por 168 horas (07 dias), de acordo com ASTM STP 1443 (HERKOVITS; PEREZ-COLL, 2003).

Utilizou-se a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS, 2018) para classificar a toxicidade aguda. Após 96 horas de exposição, as substâncias químicas podem ser classificadas em três categorias: alta toxicidade ($CL_{50} < 1$ mg/L), toxicidade moderada (CL_{50} entre 1 e 10 mg/L) e baixa toxicidade ($CL_{50} > 10$ mg/L) (GHS, 2018).

Em ambos os ensaios foram utilizadas dez larvas dispostas em recipiente de vidro contendo 500 mL de solução de diferentes concentrações dos inseticidas, com 6 réplicas, totalizando 60 larvas para cada tratamento. O controle foi realizado no mesmo delineamento, sem adição do agrotóxico na água. Os recipientes foram selados para evitar a volatilização do produto e foram mantidos com aeração constante, a fim de garantir as mesmas condições da aclimação das desovas (temperatura da água: $24 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ e concentração de oxigênio: $5 (\pm 1) \text{ mg.L}^{-1}$).

As concentrações escolhidas para os ensaios de toxicidade aguda em *P. gracilis* foram baseadas em concentrações de clorpirifós testadas em *Rhinella arenarum* por Liendro *et al.* (2015): 0, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Com base nestas, foi testada uma concentração menor e uma intermediária: 750 e 900 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Para o ensaio crônico foram escolhidas as concentrações de clorpirifós já registradas no ambiente aquático natural, 11 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MARINO; RONCO, 2005), e o valor máximo permitido na legislação brasileira, de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2011) e na legislação da Argentina de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ADENDO, 2015). Também foram incluídas as concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, consideradas

valores menores que $540 \mu\text{g.L}^{-1}$, registrado por Da Silva (2006) em água superficial. Nos ensaios agudos e crônicos, os mortos foram removidos a cada 24 horas.

A atividade natatória foi monitorada a cada 24 horas através de observação visual, durante o ensaio crônico. Utilizou-se uma escala variando de 0 a 3 para diferentes comportamentos natatórios onde: (0) correspondeu a atividade natatória igual à do controle, (1) atividade natatória inferior à do controle, (2) atividade natatória superior à do controle e (3) atividade natatória com contrações espasmódicas.

Ao final das 168 horas, os girinos foram eutanasiados com lidocaína 2% (CONCEA, 2015) e observados e fotografados em estereomicroscópio binocular para verificação de anomalias morfológicas. Os *endpoints* para anomalias morfológicas foram: (1) presença de edemas, (2) alterações na boca, (3) alterações no formato do intestino e (4) formato da cauda. As anomalias encontradas foram consideradas malformações. Após, eles foram congelados (-20°C) para as análises de biomarcadores bioquímicos.

2.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES

2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As larvas foram homogeneizadas inteiras (*pool* 50 mg) em 1 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e centrifugadas a $3000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi reservado, mantido em microtubos a -20°C e utilizado para todas as análises bioquímicas (testadas em duplicata).

2.4.2. ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A atividade da AChE foi determinada de acordo com Ellman *et al.* (1961) com algumas modificações, em microplaca. As alíquotas de sobrenadante (10 μL) foram pré-incubadas a 30°C durante 2 minutos em uma solução (33 μL) contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), DTNB (1mM) e água destilada. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 33 μL do substrato acetiltiocolina (ASCh) 1 mM. A atividade foi verificada a 412 nm, durante 2 minutos e 30 segundos e expressa em μmol de ASCh hidrolisado/min/mg de proteína.

2.4.3. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)

A atividade de BChE foi verificada pelo método descrito por Ellman *et al.* (1961) com algumas modificações. As microplacas contendo amostras (10 µL) foram pré-incubadas a 30°C durante 2 minutos em uma solução contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), DTNB 1 mM e água destilada. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 33 µL do substrato butirilcolina (BTC) 20 nM. A atividade foi verificada a 412 nm, durante 5 minutos e expressa em µmol de BTC hidrolisado/min/mg de proteína.

2.4.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade GST foi determinada por uma modificação do procedimento descrito por Habig *et al.* (1974). Em uma microplaca foram adicionados 10 µl de amostra, 150 µl de tampão fosfato de potássio (20 mM, pH 6,5), 50 µl de glutathiona reduzida (GSH) e 50 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). 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.

2.4.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade de SOD foi determinada pelo método de Misra e Fridovich (1972) com algumas modificações. O ensaio foi realizado em microplacas e nessas, foram pipetados 5, 10, 15 e 20 µL de amostra, e 190, 185, 180 e 175 µl de tampão glicina, respectivamente (50 mM, pH 10,6 - mantido a 37°C em banho-maria) e 5 µL de adrenalina (60 mM). Este método baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. Uma unidade de SOD corresponde a quantidade da enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação da adrenalina. A absorbância foi determinada em modo cinético a 480 nm durante 10 minutos. A atividade da SOD foi expressa em UI SOD/mg de proteína.

2.4.6 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método de Nelson e Kiesow (1972), em cubeta. A mistura de ensaio consistiu em 1000 µl

de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), 10 µl de amostra e 50 µl de H₂O₂ (0,3 M). A mudança de absorbância devido ao consumo do H₂O₂ pela catalase foi medida a 240 nm durante 10 minutos. A atividade da enzima foi expressa em µmol/min/mg de proteína.

2.4.7 NÍVEIS DE TIOIS NÃO PROTEICOS

Os níveis de tiois não proteicos foram determinados por uma modificação do método de Ellman (1959). Inicialmente 100 µL do homogeneizado foram misturados com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos. Em microplaca, 30 µl do sobrenadante desproteinizado, 70 µL de água destilada, 100 µL de tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e 10 µl de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM) foram pipetados. Após incubação no escuro durante 20 minutos, a absorbância foi medida a 412 nm. Os níveis de tiois não proteicos foram expressos como µmol SH/g de tecido.

2.4.8 NÍVEIS DE PROTEÍNA CARBONIL

Os níveis de proteína carbonilada foram verificados pelo método de Yan *et al.* (1995) com algumas modificações. No ensaio, 200 µL de amostra foram misturados a 800 µl de água destilada, 150 µl de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (10 mM) e 150 µl de ácido clorídrico (2N). A mistura foi incubada no escuro, em temperatura ambiente, durante 60 min. Após, foram adicionados sequencialmente: 125 µL de tampão fosfato de sódio (150 mM, pH 6,8) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) 3%, 500 µL de etanol (99,8%) e 500 µL de heptano (99,5%). Essa mistura foi agitada em vórtex durante 30 segundos e após, centrifugada a 3000 x g durante 15 minutos. Na sequência, a proteína isolada a partir da interface foi lavada por ressuspensão em etanol/acetato de etila (1:1). Em seguida, foi adicionado 250 µL de tampão desnaturante (SDS 3%) e 200 µL da mistura foram pipetados em uma microplaca. Para cada amostra foi incluído um branco incubado com HCl (2N) sem DNPH. A absorbância foi medida a 370 nm. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 22.000 M/cm. O conteúdo de proteína carbonil foi expresso como nmol de proteína carbonilada/mg de proteína.

2.4.9 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi medida através da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com método de Buege e Aust (1978) com algumas modificações. 50 µL de amostra foi misturada com 50 µL de TCA 10%, seguido por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos. 30 µL do sobrenadante foram misturados com 100 µL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e incubados a 100°C, durante 30 minutos. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 532 nm. O malondialdeído (MDA) foi usado como padrão e a peroxidação lipídica foi expressa em nmol de MDA/mg proteína.

2.4.10 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) *Coomassie Blue* utilizando albumina de soro bovino como padrão. A absorbância da amostra foi medida a 595 nm.

2.5 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO

A avaliação de risco ecológico foi determinada através de um quociente de risco agudo (Equação 1) e crônico (Equação 2) que relaciona a concentração máxima do toxicante encontrada no ambiente (CEA) e um valor de referência, a partir do qual verifica-se efeitos adversos. Para calcular o risco agudo foi utilizada a CL_{50} e para calcular o risco crônico a concentração de efeito não observado (CENO). Para clorpirifós a CEA foi de 540 µg.L⁻¹, registrado por Da Silva (2006) em água superficial.

$$HQ = CEA/CL_{50} \quad (1)$$

$$CHQ = \frac{CEA}{CENO} \quad (2)$$

Para análise do nível de preocupação (LOC – *level of concern*), utilizou-se o parâmetro da Usepa (1998), onde o risco agudo para animais aquáticos (LOC) é de 0,5. Caso o valor de HQ for superior ao LOC conclui-se que existe potencial de risco agudo para organismos aquáticos não alvo. No risco crônico, o valor de LOC é igual 1, logo, se HQ for superior a 1 conclui-se que existe potencial de risco crônico para organismos aquáticos não alvo.

A avaliação de risco foi realizada somente para os *endpoints* que foi possível determinar a CENO.

2.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados do ensaio agudo foram analisados pelo método TSK – Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THRUSTON, 1977), através do *software* GBasic, com nível de significância de 95%. Os dados do ensaio crônico foram testados quanto a normalidade pelo método de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade das variâncias por Bartlett. Os resultados foram analisados utilizando-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) para determinar a diferença entre os tratamentos, teste de Tukey para comparação entre todos os tratamentos e Dunnett, para comparação de cada tratamento em relação ao controle. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) entre tratamentos e controle, sendo utilizados os *software* *Statistica 8.0* e *GraphPad Prism 7.0*.

Para a determinação da concentração de efeito observado (CEO) e a concentração de efeito não observado (CENO) foi utilizada a ANOVA, seguida do teste de Dunnett. A máxima concentração do toxicante (MATC) ou valor crônico (VC) foi calculada pela média geométrica entre CENO e CEO.

3. RESULTADOS

3.1 TOXICIDADE AGUDA

A CL_{50} de clorpirifós para larvas de *P. gracilis* foi de $893,59 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($+95\% = 938,79 \mu\text{g.L}^{-1}$; $-95\% = 850,58 \mu\text{g.L}^{-1}$). A maior taxa de mortalidade ocorreu em 24 e 48 horas de exposição, em concentrações acima de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 1 e Figura 3). A concentração do inseticida influenciou significativamente na mortalidade das larvas em relação ao controle ($F_{5,18} = 20,43$; $p < 0,01$) mas não houve efeito no tempo de exposição ($F_{3,16} = 2,88$; $p = 0,07$).

Tabela 1 - Mortalidade das larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a formulação comercial de clorpirifós (750-2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) ao longo de 96 horas (ensaio agudo).

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h	96 h	Mortalidade total	Mortalidade (%)
0	0	0	0	0	0	0,0
750	0	3	2	1	6	10,0
900	4	4	4	2	14	23,3
1000	20	21	12	3	56	93,3
1500	23	16	7	2	48	80,0
2000	32	22	3	3	60	100,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

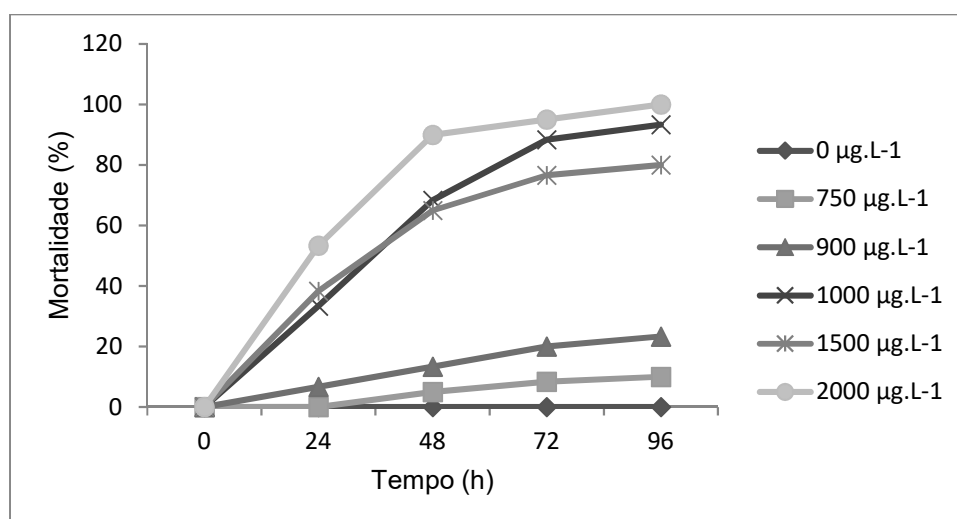


Figura 3 - Mortalidade cumulativa (%) de larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de clorpirifós durante o ensaio agudo. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

3.2 TOXICIDADE CRÔNICA

3.2.1 MORTALIDADE

Em todas as concentrações subletais testadas foram registradas mortes de larvas (Tabela 2 e Figura 4). As concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de clorpirifós influenciaram significativamente na mortalidade das larvas de *P. gracilis* ($F_{5,36} = 3,06$; $p = 0,002$; Tukey, $p < 0,05$), mas não houve diferença significativa no tempo de exposição ($F_{6,35} = 3,38$; $p = 0,09$).

Tabela 2 - Mortalidade das larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a concentrações subletais da formulação comercial de clorpirifós (11-500 µg.L⁻¹) ao longo de 168 horas (ensaio crônico).

Concentração µg.L ⁻¹	Mortalidade							Total	Total (%)
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h		
0	0	0	1	1	0	0	0	2	3,33
11	1	0	1	2	0	2	4	10	16,67
30	0	0	0	0	0	2	8	10	16,67
90	0	0	0	2	1	5	5	13	21,67
250	1	1	6	2	3	6	7	26	43,33
500	1	6	0	3	5	9	7	31	51,67

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

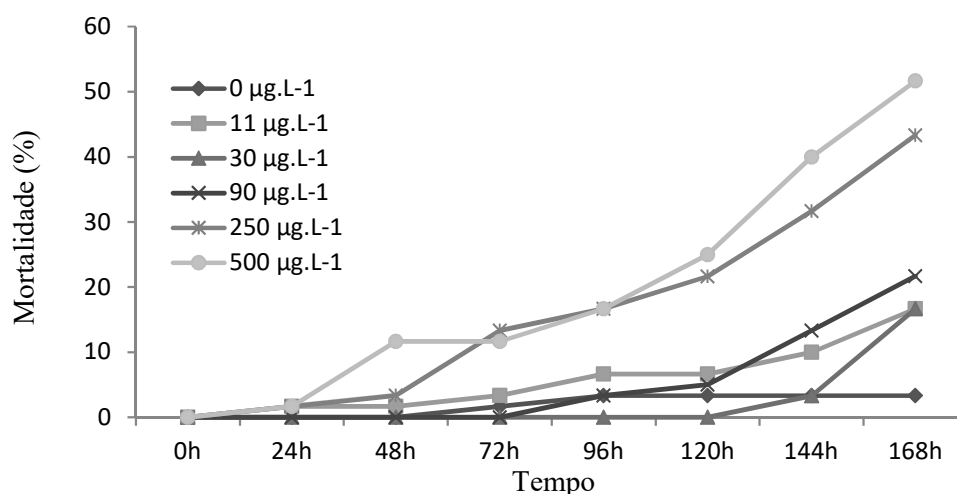


Figura 4 - Mortalidade cumulativa (%) de larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de clorpirifós durante o ensaio crônico. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

3.2.2. ATIVIDADE NATATÓRIA

Em todas as concentrações testadas as larvas apresentaram alterações na atividade natatória (Figura 5) em relação ao controle. Do total de larvas expostas, 56,7% (média $\pm$ desvio padrão = $5,67 \pm 2,08$; min - máx = 1 - 9) apresentaram contrações espasmódicas e 18,3% ($1,83 \pm 1,23$; 0 - 4) redução da atividade natatória. Houve diferença significativa na atividade natatória das larvas expostas em relação ao controle ($F_{4,25} = 25,73$; $p < 0,05$). Todas as concentrações testadas causaram espasmos nas larvas (Figura 5A) em relação

ao controle ($F_{5,30}=32,87$; $p<0,05$). Para mobilidade reduzida, ocorreu efeito significativo em relação ao controle nas concentrações de 90, 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($F_{5,30}=9,35$; $p<0,05$) (Figura 5B).

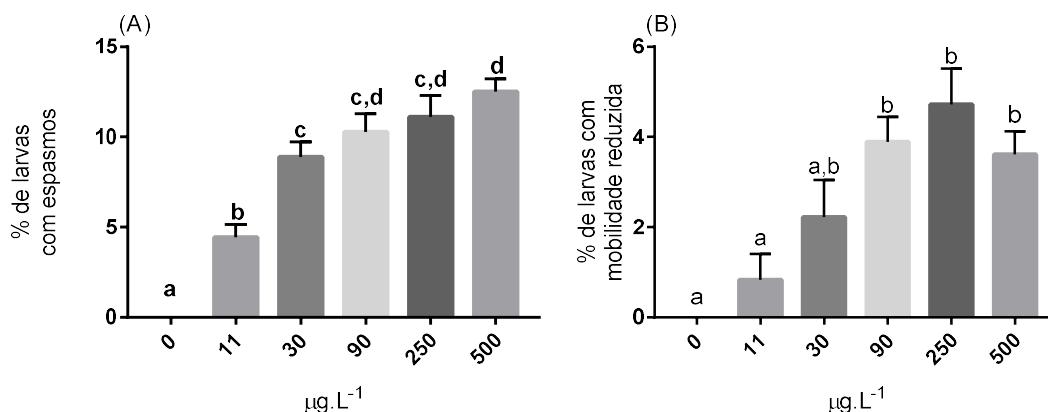


Figura 5 - Alterações observadas na atividade natatória de larvas de *Physalaemus gracilis* expostas à formulação comercial de clorpirifós (11-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em 168 horas, sendo (A) a porcentagem de larvas com espasmos e (B) com mobilidade reduzida. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

3.2.3 MALFORMAÇÕES

As malformações encontradas foram ausência de queratodontes na boca (Figura 6B e C), lábio (Figura 6B e C) e intestino mal formado (Figura 7B). Em média, $4,83 \pm 7,57$ (0 - 19) dos indivíduos expostos apresentaram anormalidades na boca e $6,33 \pm 9,42$ anormalidades no intestino (0 - 22), sendo estas mais evidentes nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 3). Houve diferença significativa das larvas expostas a formulação comercial de clorpirifós em relação ao controle para anomalia na boca ($F_{5,30}= 10,30$; $p<0,05$) e intestino ($F_{5,30}= 9,24$; $p<0,05$), ambos significativo para 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p<0,05$). No grupo controle não houve alteração nos parâmetros avaliados (Tabela 3).

Tabela 3 - Malformações observadas em larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a formulação comercial de clorpirifós ($11-500 \mu\text{g.L}^{-1}$) após 168 horas.

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Anomalia na boca	Anomalia no intestino	Nº de larvas sem anomalia	Nº de larvas com anomalias
0	0	0	60	0
11	1	0	59	1
30	1	2	57	3
90	0	0	60	0
250	8	14	38	22
500	19	22	19	41

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.



Figura 6 - Malformação na boca de larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a clorpirifós por 168 horas. Boca de uma larva do controle negativo (A). Boca de larva exposta a concentração de $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ (B e C). **Fonte:** A autora, 2018.

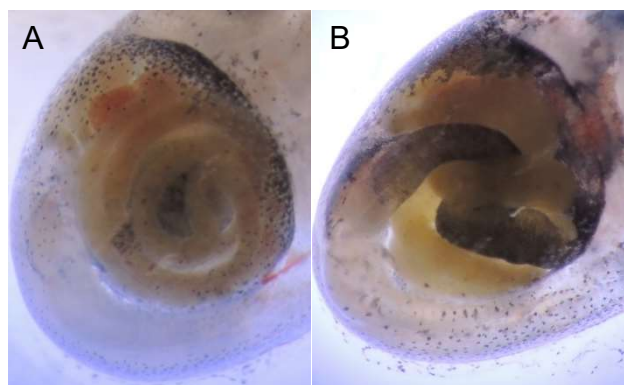


Figura 7 - Malformação no intestino de larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a clorpirifós por 168 horas. Intestino de uma larva do controle negativo (A) e intestino após a exposição a concentração de $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ (B). **Fonte:** A autora, 2018.

3.2.3 BIOMARCADORES

Após 168 horas de exposição ao clorpirifós, houve inibição significativa em relação ao controle de 36,36% e 36,04% na atividade da AChE das larvas expostas a 250 e $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (Figura 8A). Não houve alteração da atividade da BChE (Figura 8B) quando comparada ao controle em nenhuma concentração testada.

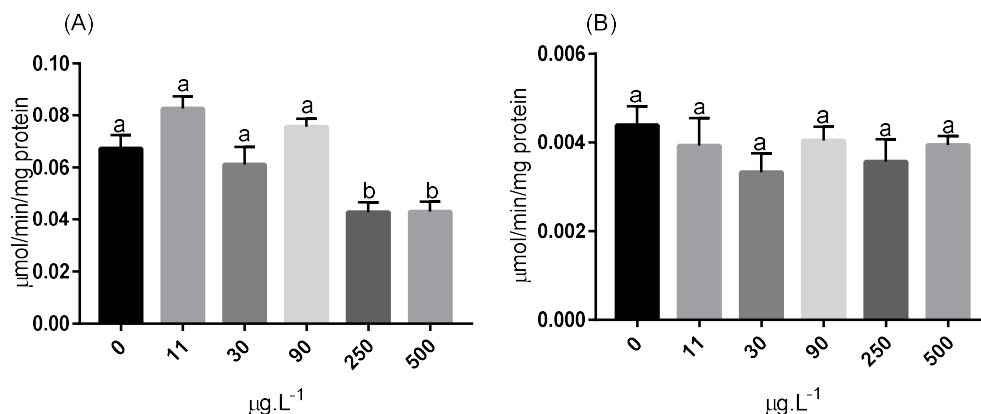


Figura 8 - Atividade das enzimas AChE (A) e BChE (B) em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de clorpirifós. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Ocorreu ativação na atividade da SOD em relação ao controle, sendo de 39,40% na concentração de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$, de 51,56% em 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de 39,90% em 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 9A). A ativação também foi registrada na atividade da CAT (Figura 9B) em todas as concentrações em relação ao controle, sendo 88,23 % em 11 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 85,29% em 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 102,94% em 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 108,82% em 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 123,53% em 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Já a atividade da GST (Figura 9C) mostrou-se ativada em relação ao controle a partir da concentração de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo 37,71% em 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 69,40% em 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 50,37% em 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 57,81% em 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os níveis de tiois não proteicos (Figura 9D) apresentaram um aumento em 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (14,88%), 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (11,98%), 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (8,06%) e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (13,36%).

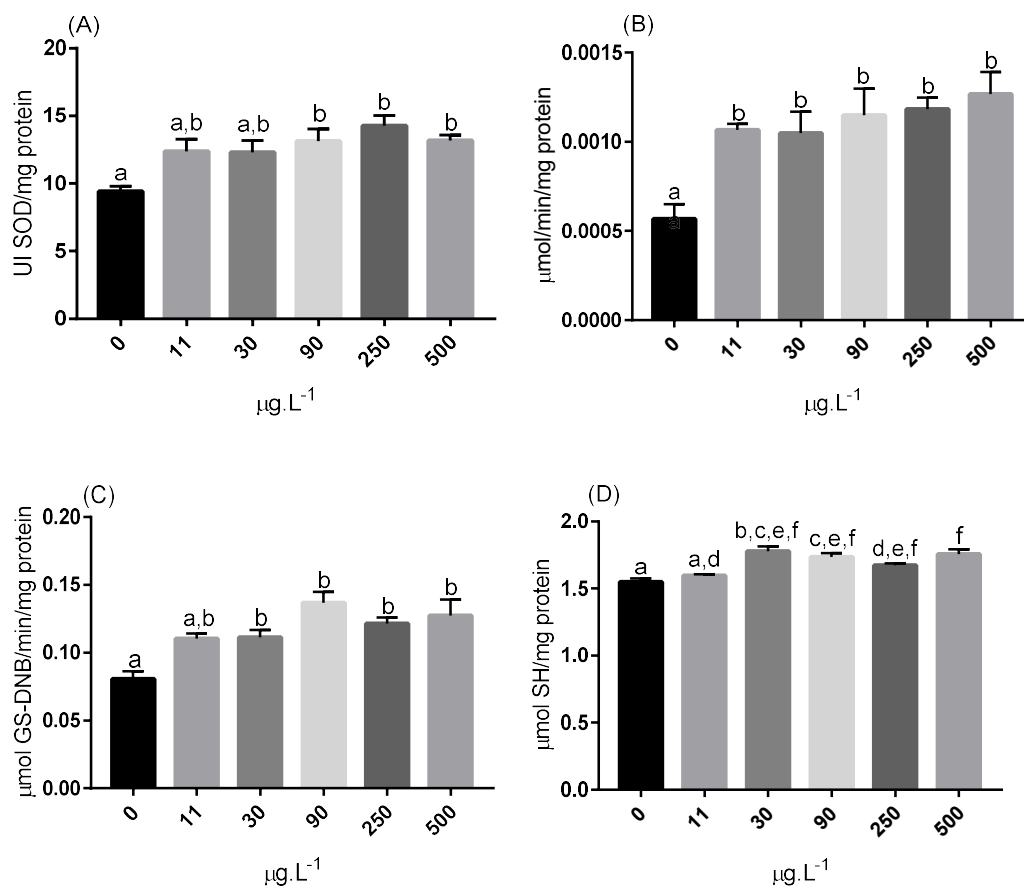


Figura 9 - Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), GST (C) e níveis de tiois não proteicos (D) em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de clorpirifós. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Os níveis de proteína carbonil (Figura 10A) aumentaram em relação ao controle nas concentrações de 90 µg.L⁻¹ (40,63%), 250 µg.L⁻¹ (69,45%) e 500 µg.L⁻¹ (65%). Os níveis de TBARS (Figura 10B) não apresentaram alteração em relação ao controle em nenhuma concentração.

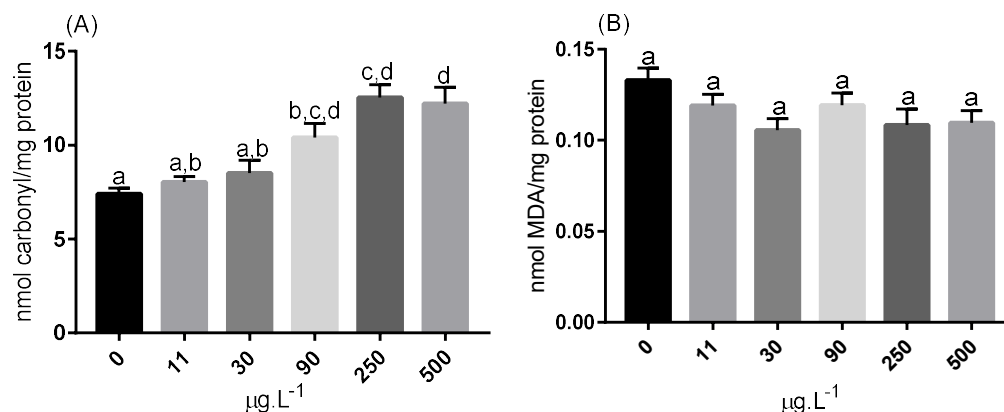


Figura 10 - Níveis de proteína carbonil (A) e TBARS (B) em girinos de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de clorpirifós. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

3.2.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

A CENO de clorpirifós ficou entre 11 e 250 µg.L⁻¹ e a MATC entre 18,17 e 353,55 µg.L⁻¹ para *P. gracilis* (Tabela 4). A máxima concentração de clorpirifós encontrada no ambiente foi de 540 µg.L⁻¹ (DA SILVA, 2006), utilizada na avaliação de risco para calcular o quociente de risco agudo (HQ) e crônico (CHQ). O quociente de risco agudo e crônico (Tabela 4) para todos os *endpoints* foi superior ao nível de preocupação para animais aquáticos (LOC=0,5 para risco agudo e 1 para risco crônico), logo existe potencial de risco para a espécie testada.

Tabela 4 - Avaliação de risco ecológico para larvas de *Physalaemus gracilis* expostas ao clorpirifós.

Ensaio	CL ₅₀ (µg.L ⁻¹)	CENO (µg.L ⁻¹)	CEO (µg.L ⁻¹)	MATC (µg.L ⁻¹)	Endpoint	Risco ecológico	Avaliação
Agudo	893,59	-	-	-	Mortalidade	HQ=0,56	Alto risco Necessita avaliação
	-	250	500	353,55	Mortalidade	CHQ=2,16	
Crônico	-	11	30	18,17	Atividade natatória	CHQ=49,09	Alto risco Necessita avaliação
	-	90	250	150	Malformação (boca e intestino)	CHQ=6	

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

4 DISCUSSÃO

A formulação comercial testada apresentou alta toxicidade aguda para larvas de *P. gracilis*, enquadrando-se na categoria 1 de risco agudo de acordo com o GHS (2018). No entanto, a CL_{50} foi maior do que a registrada para outras espécies de anfíbios, como *Hoplobatrachus tigerinus* ($19 \mu\text{g.L}^{-1}$; ABBASI; SONI (1991)), *Rhinella fernandezae* ($151 \mu\text{g.L}^{-1}$; DE ARCAUTE *et al.*, (2012)) e *Bufo gargarizans* ($800 \mu\text{g.L}^{-1}$; YIN *et al.*, (2009)) e um pouco menor do que a encontrada para *Anaxyrus americanus* ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$; COWMAN; MANZANTI (2000)). Esses dados mostram diferente comportamento entre as espécies de anfíbios, mas todas sensíveis a concentrações de clorpirifós categorizadas como risco agudo (CL_{50} inferior ou igual a 1 mg.L^{-1}). Assim, clorpirifós pode ser considerado um inseticida com clara toxicidade aguda para anfíbios, um organismo não alvo.

Além disso, na exposição crônica, cerca de $\frac{1}{4}$ da concentração de toxicidade aguda ($250 \mu\text{g.L}^{-1}$) de clorpirifós foi capaz de matar praticamente metade das larvas de anfíbios expostas por uma semana. Esses resultados são coerentes com toxicidade aguda, mas em concentração crônica que pode ser encontrada na natureza. Estudos mostram que concentrações subletais de clorpirifós causam mortalidade em larvas de anfíbios, como verificado em *Rhinella fernandezae* expostas a uma formulação comercial e apresentando $CL_{50,120h}=113 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $CL_{50,216h}=16 \mu\text{g.L}^{-1}$ (DE ARCAUTE *et al.*, 2012) e, em *Ceratophrys ornata* exposta a clorpirifós com 95,1% de pureza e com $CL_{50,240h}=13 \mu\text{g.L}^{-1}$ (SALGADO COSTA *et al.*, 2018).

As concentrações crônicas testadas causaram malformações, alterações na atividade natatória e em alguns biomarcadores de *P. gracilis*. Durante o desenvolvimento larval, a ocorrência de malformações pode estar relacionada a processos que causam estresse oxidativo, consequentemente, podem comprometer o reparo do DNA e a transdução de sinal mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) (WELLS *et al.*, 2005). Com isso, as anomalias bucais e intestinais verificadas em *P. gracilis* exposta ao clorpirifós podem estar associadas ao desequilíbrio de EROs. Anomalias morfológicas em função da exposição ao clorpirifós também foram encontradas no estudo de Liendro *et al.*, (2015) no qual larvas de *Rhinella arenarum* expostas ao

clorpirifós apresentaram flexão e necrose na cauda, bem como a presença de edemas, possivelmente desencadeadas pelo desequilíbrio de EROs.

É conhecido que malformações na boca de larvas de anfíbios podem ser causadas pelo fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) (KNAPP; MORGAN, 2006; VENESKY *et al.*, 2010). Contudo, como não foram encontradas malformações na boca das larvas do grupo controle, esta hipótese pode ser descartada e é possível relacionar esta anomalia com a exposição ao clorpirifós. A falta de queratinização na boca pode comprometer a alimentação das larvas, bem como, aumentar a suscetibilidade a predadores, além de afetar a função dos anfíbios como predadores na cadeia alimentar e levar a morte (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015).

Organofosforados como o clorpirifós, interferem na enzima acetilcolinesterase nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central (GÓMEZ-CANELA *et al.*, 2017). O clorpirifós além de possuir potencial de inibir a enzima AChE, causa distúrbios comportamentais, sensoriais, de locomoção e morte em organismos não alvo (ROBERTS; REIGART, 2013). A inibição na atividade da AChE observada nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e as alterações na atividade natatória, verificadas nessas concentrações, podem estar relacionadas ao mecanismo de ação do clorpirifós. A inibição da enzima resulta em acúmulo do neurotransmissor acetilcolina que, por sua vez, provoca espasmos musculares e alterações na função motora (ROBERTS; REIGART, 2013). Neste estudo, a inibição da AChE pode ter comprometido a atividade natatória de *P. gracilis*, o que prejudica a alimentação e o predispõe à predação e conseqüentemente, morte. Inibição da atividade da AChE também foi verificada em *Rhinella arenarum* (ATTADEMO *et al.*, 2017; LIENDRO *et al.*, 2015) e *Lysapsus limellium* coletadas em campos de arroz, contendo resíduos de clorpirifós na água (ATTADEMO *et al.*, 2015). Outros organofosforados, como o metidation, causaram efeito semelhante em larvas de *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* e *Xenopus laevis* (GÜNGÖRDÜ, 2013) bem como o glifosato em *Rhinella arenarum* (LAJMANOVICH *et al.*, 2013, 2011).

Apesar da inibição da AChE ter ocorrido somente nas concentrações mais elevadas, foram observadas alterações na atividade natatória nas larvas expostas as concentrações de 11, 30 e 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Esta resposta pode estar

relacionada com os processos de polarização, despolarização e repolarização das células nervosas, visto que o clorpirifós pode causar alteração no equilíbrio iônico (MEHTA *et al.*, 2005). Alguns inseticidas afetam o fluxo de íons de sódio e reduzem a estabilidade do estado de repouso da célula, provocando em organismos hiperexcitabilidade e tremores (NARAHASHI, 1996; COATS, 2008), conforme observado neste estudo.

A alteração na atividade natatória também foi observada em outros anfíbios expostos a inseticidas, como em *Hypsiboas pulchellus* exposto a cipermetrina (AGOSTINI *et al.*, 2010), *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* e *Xenopus laevis* expostos ao metidation (GÜNGÖRDÜ, 2013), *Ambystoma maculatum* exposto a permetrina e fenvalerato (BERRILL *et al.*, 1993), *Rana blairi* exposta ao carbaril (BRIDGES, 1997) e *Ambystoma macrodactylum* exposta ao metoxicloro (INGERMANN *et al.*, 2002). A dificuldade de locomoção durante a fase larval dos anfíbios pode resultar em maior suscetibilidade a predadores, dificuldade para obtenção de alimento, morte e, conseqüentemente, redução das populações (PELTZER *et al.*, 2013; RUTKOSKI *et al.*, 2018; WRUBLESKI *et al.*, 2018).

Respostas bioquímicas são utilizadas como biomarcadores de contaminação ambiental especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo, visto que, a detoxificação de xenobióticos é acompanhada de uma alta geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxidos (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$) (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998; LÓPEZ-BAREA, 2000; JIN *et al.*, 2015). Os agrotóxicos possuem potencial de aumentar a formação de EROS e/ou alterar os sistemas de eliminação de radicais livres (JIN *et al.*, 2015; 2011). As enzimas SOD e CAT atuam em sinergismo para regular os níveis de radicais superóxido e peróxidos para evitar dano oxidativo (HERNÁNDEZ *et al.*, 2016; HIPÓLITO *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 1999; ZIMATKIN *et al.*, 2006). O aumento na atividade da CAT em todas as concentrações e da SOD nas concentrações de 90, 250 e 500 $\mu g.L^{-1}$ indicam que a exposição ao clorpirifós promoveu maior formação das EROS $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , sendo uma resposta característica da toxicidade do xenobiótico (JOHN *et al.*, 2001).

A GST pertence a fase II da biotransformação, atuando em processos de detoxificação de xenobióticos, tornando-os mais hidrofílicos para facilitar a excreção (SHEEHAN *et al.*, 2001). O aumento da atividade de GST em *P. gracilis* nas concentrações de 30, 90, 250 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ indica que o organismo desenvolveu mecanismos para tentar reverter os efeitos do clorpirifós. Juntamente com CAT e SOD, a maior atividade de GST mostra um aumento nos processos de detoxificação para evitar danos a biomoléculas, mantendo a integridade dos processos celulares (PELTZER *et al.*, 2013; SOTOMAYOR *et al.*, 2015). Em adição, a GSH pode conjugar compostos eletrofílicos sob a ação da GST e também, atuar em conjunto com a glutathione peroxidase (GPx) contra H_2O_2 e peróxidos lipídicos (DRINGEN *et al.*, 2000). Os níveis de tiois não proteicos podem aumentar em função de uma resposta adaptativa do organismo contra os efeitos danosos das EROs (CHAÂBANE *et al.*, 2018) com a finalidade de proteger as células de efeitos deletérios do clorpirifós, como verificado em *P. gracilis* a partir da concentração de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Neste estudo, *P. gracilis* apresentou mecanismos bioquímicos para combater a toxicidade da formulação comercial testada. A resposta antioxidante do anfíbio provavelmente é devido a ativação da atividade da SOD, CAT, GST e aumento nos níveis de tiois não proteicos. Resultados semelhantes foram verificados em outras espécies de anfíbios, como o aumento na atividade da CAT em *Rhinella arenarum* exposta a clorpirifós (SOTOMAYOR *et al.*, 2015), da SOD e tiois em *Bufo bufo gargarizans* expostos ao inseticida espirotetramate (YIN *et al.*, 2014), em *Lithobates catesbeiana* exposta ao glifosato (COSTA *et al.*, 2008) e, de GST e CAT em larvas de *Trachycephalus typhonius* expostas a sedimentos de lagoas próximas de atividades agroindustriais (PELTZER *et al.*, 2013).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e redução da capacidade antioxidante resulta em dano oxidativo (AHMAD *et al.*, 2000; FERREIRA, 2010). As EROs em excesso reagem com biomoléculas, como lipídeos e proteínas, comprometendo a viabilidade celular (YU, 1994). Neste estudo, o aumento nos níveis de proteína carbonil a partir da concentração de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$, indicam ocorrência de danos oxidativos as proteínas das larvas de *P. gracilis* expostas a clorpirifós, apesar do aumento nos mecanismos antioxidantes.

A formação de TBARS está relacionada à ocorrência de peroxidação lipídica (LUSHCHAK; BAGNYUKONA, 2006). A ausência de efeito encontrada nas concentrações indica que *P. gracilis* resistiu ao dano lipídico através da utilização de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (tiois não proteicos).

O inseticida testado apresentou risco agudo e crônico para *P. gracilis*, mostrando que é tóxico para anfíbios e que deveria ser reavaliado para espécies não-alvo. Além disso, a máxima concentração de toxicante aceitável para o *endpoint* atividade natatória ficou abaixo do limite permitido pela legislação brasileira (18,17 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e para anomalias morfológicas abaixo das concentrações máximas encontradas em ambiente aquático (150 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Isto pode implicar no desenvolvimento de larvas anormais e com capacidade de sobrevivência reduzida.

5 CONCLUSÃO

P. gracilis mostrou-se um bom bioindicador para avaliar o impacto de formulações comerciais de agrotóxicos através dos biomarcadores utilizados. A avaliação de risco ecológico apontou que o clorpirifós, na formulação comercial estudada, apresenta risco agudo e crônico para a espécie testada. Todos os efeitos observados nesse estudo (mudanças nos padrões de natação, indução de anomalias bucais e intestinais e alterações nos biomarcadores de neurotoxicidade e de estresse oxidativo) são relevantes para a sobrevivência das larvas em seu habitat natural e podem alterar a integridade dos ecossistemas.

As concentrações subletais de clorpirifós testadas são encontradas nos ambientes aquáticos naturais e podem estar presentes em agroecossistemas. Além disso, as concentrações de 30 e 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ são toleradas na água de consumo humano pela legislação do Brasil e da Argentina, respectivamente. Estas concentrações foram capazes de causar efeitos tóxicos em *P. gracilis*, indicando que é necessária a reavaliação desses limites. Contudo, estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos de formulações comerciais que ocasionam os efeitos encontrados neste anfíbio e em outras espécies aquáticas.

REFERÊNCIAS

ABBASI, S. A., SONI, R. Evaluation of water quality criteria for four common pesticides on the basis of computer-aided studies. **Indian Journal Environmental Health**, v. 33, p. 22–24, 1991.

ABOU-DONIA, M. B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. **Archives of Environmental Health**, v. 58, p. 487- 497, 2003.

ADENDO. **SEGUNDA CAMPAÑA LIMNOLOGICA**. ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL APROVECHAMIENTOS HIDROELÉCTRICOS DEL RÍO SANTA CRUZ, PROVINCIA DE SANTA CRUZ. 2015. Disponível em: <http://www.santacruz.gov.ar/ambiente/audiencia_publica/Rio_Santa_Cruz/informe/EIA%20PRESAS%20SC%20-%20Adenda%20da%20Campa%C3%B1a%20Limnologica%20-%20Anexo%20III%20-%20Rev0.pdf>. Acesso em: abr. 2017.

AGOSTINI, M.G.; NATALE, G.S.; RONCO, A.E. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1545–1550, 2010.

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 effluente exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

ANVISA. **C20 – Clorpirifós**. 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae>>. Acesso em: 02 mar. 2018.

ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M., JUNGES, C. M.; LORENZATTI, E.; ARÓ, C.; GRENÓN, P. Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura : Hylidae) exposed to chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 287–294, 2015.

ATTADEMO, A.M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; LAJMANOVICH, R.C.; PELTZER, P.M. Effect of diet on carboxylesterase activity of tadpoles (*Rhinella arenarum*) exposed to chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 10-16, 2017.

BARNES, F.S.; GREENEBAUM, B. **Handbook of biological effects of electromagnetic fields**. 3 ed. Boca Raton, FL: CRC, 2006.

BERRILL, M.; BERTRAMA, S.; WILSON, A.; LOUIS, S.; BRIGHAMAN, D.; STROMBERG, C. Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 525–539, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDÃO, F. P.; MARQUES, S.; RODRIGUES, S.; SANTOS, B.; TRAVASSO, R.; VENÂNCIO, C.; PEREIRA, R.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M.; SOARES, A. M. V. M.;

GONÇALVES, F. LOPES, I. Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi*. **Captar**, v. 3, p. 66–77, 2011.

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. Brasília, 2011.

BRIDGES, C.M. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1935–1939, 1997.

BUEGE, J.A.; AUST, S. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302–309, 1978.

CHAÂBANE, M.; ELWEJ, A.; GHORBEL, I.; CHELLY, S.; MNIF, H.; BOUDAWARA, T.; ELLOUZE CHAABOUNI, S.; ZEGHAL, N.; SOUDANI, N. Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 645–652, 2018.

COATS, J. R. Toxicology of synthetic pyrethroid insecticides in fish: a case study. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Ed). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 805-818.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Concea Normativa Nº 21, de 20 de Março de 2015**. Brasília, 2015.

COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 1 – 13, 2006.

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, n. 3, p.153-163, 2008.

COWMAN, D. F.; MANZANTI, L.E. **Ecotoxicology of “new generation” pesticides to amphibians**. In: Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. SETAC Technical Publication, p. 233–268, 2000.

DA SILVA, I.L.A. **Monitoração de pesticidas em ambientes de intensa atividade agrícola na região do norte fluminense**. 2006. 43 f. Monografia (Licenciatura em Química) - Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.

DE ARCAUTE, C.R.; COSTA, C.S.; DEMETRIO, P.M.; NATALE, G.S.; RONCO, A.E. Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban48E formulation of chlorpyrifos. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 2338–2348, 2012.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4912–4916, 2000.

EATON, D. L.; DAROFF, R. B.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L. G.; COYLE, J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W. C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.;

SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P. S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 2, p. 1-125, 2008.

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

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

EVANS, J.; FERNÁNDEZ, B. A.; GAVILÁN, G. A.; IZE, L. I.; MARTÍNEZ, C. M. A.; RAMÍREZ, R. P.; ZUK, M. **Introducción al análisis de riesgos ambientales**. 2ª Ed. México: Instituto Nacional de Ecología, 2003. 220 p.

FELLERS, G. M.; MCCONNELL, L. L.; PRATT, D.; DATTA, S. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada mountains of California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2170 – 2177, 2004.

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.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 28 nov.2018.

GHS.Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. **Environmental Risk Assessment**. 2018. Disponível em: <https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/ecotox_aquatic_toxicity.html>. Acesso: 3 jul. 2018.

GÓMEZ-CANELA, C.; PRATS, E.; PIÑA, B.; TAULER, R. Assessment of chlorpyrifos toxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) metabolism. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 1231–1243, 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.

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.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THRUSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 714-718, 1977.

HARTMANN, C.C. **Avaliação de um efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas**. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

HAYES, T.B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921-933, 2010.

HEALTH CANADA. **Water Quality**: reports and publications. Guidelines for Canadian drinking water quality. Chemical/Physical Parameters. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/water-quality/guidelines-canadian-drinking-water-quality-summary-table-health-canada-2012.html>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S. AMPHITOX: A customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. Symposium on multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations. In: LINDER, G. L.; KREST, S.; SPARLING, D.; LITTLE, E. E. Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations. ASTM International STP 1443, USA, p. 46-60, 2003.

HERNÁNDEZ, J.A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R.C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-15, 2016.

HIPÓLITO, L.; SÁNCHEZ, M.J. POLACHE, A.; GRANERO, L. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. **Current Drug Metabolism**, v. 1, p. 716-727, 2007.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

INGERMANN, R.L.; BENCIC, D.C.; VERRELL, P. Methoxychlor alters the predator-prey relationship between *Dragonfly naiads* and Salamander larvae. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 68, n. 6, p. 771-778, 2002.

JIN, Y.; ZHENG, S.; PU, Y.; SHU, L.; SUN, L.; LIU, W.; FU, Z. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 82, p. 398-404, 2011.

JIN, Y.; LIU, Z.; PENG, T.; FU, Z. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, p. 405-414, 2015.

JOHN, S.; KALE, M.; RATHORE, N.; BHATNAGAR, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 500-504, 2001.

KAMRIN, M.A. **Pesticide Profiles**: Toxicity, Environmental Impact, and Fate. CRC Press, Boca Raton, 1997.

KNAPP, R. A.; MORGAN, A.T. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. **Copeia**, p. 188-197, 2006.

KI, Y. W.; PARK, J. H.; LEE, J. E.; SHIN, I. C.; KOH, H. C. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 218, n. 3, p. 235-245, 2013.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, p. 133–151, 2015.

KOYAMA, J. Vertebral deformity susceptibilities of marine fishes exposed to herbicide. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 655–662, 1996.

LAJMANOVICH, R.C.; ATTADEMO, A.M.; PELTZER, P.M.; JUNGES, C.M.; CABAGNA, M.C. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 60, n. 4, p.681-689, 2011.

LAJMANOVICH, R. C.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; BASSO, A. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 224, 2013.

LAVILLA, E.; KWET, A.; SEGALLA, M. V.; LANGONE, J.; BALDO, D. ***Physalaemus gracilis***. The IUCN Red List of Threatened Species, 2010. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/details/57258/0>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

LI, B.; MA, Y.; ZHANG, Y. H. Oxidative stress and hepatotoxicity in the frog, *Rana chensinensis*, when exposed to low doses of trichlorfon. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 7, p. 476-482, 2017.

LIENDRO, N., FERRARI, A., MARDIROSIAN, M., LASCANO, C.I., VENTURINO, A. Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 525–535, 2015.

LINGNAU, R. **Distribuição temporal, atividade reprodutiva e vocalizações em uma assembleia de anfíbios anuros de uma floresta ombrófila mista em Santa Catarina, sul do Brasil**. 2009. 103 f. Tese de Doutorado – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

LIZANO-FALLAS, V.; MASÍS-MORA, M.; ESPINOZA-VILLALOBOS, D.; LIZANO-BRENES, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. **Chemosphere**, v.182, p.106-113, 2017.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, p.3-15, 1998.

LÓPEZ-BAREA, J. Biomarcadores moleculares de estrés oxidativo y contaminación ambiental. **Revista Toxicology**, v. 17, p. 12-18, 2000.

LUSHCHAK, V.; BAGNYUKONA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 283-289, 2006.

MACKAY, D.; GIESY, J. P.; SOLOMON, K. R. Fate in the environment and long-range

atmospheric transport of the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos and its oxon. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 231, p. 35–76, 2014.

MANN, R.M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C.B.; WILSON, S.P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p.2903-2927, 2009.

MARINO, D.; RONCO, A. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, p. 820–826, 2005.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. 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, 1972.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p.474-478, out. 1972.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011. 1153p.

PALENSKE, N. M.; NALLANI, G. C.; DZIALOWSKI, E. M. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 2, p.232-240, 2010.

PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADAMO, A. M.; JUNGES, C. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; REPETTI, M. R.; SIGRIST, MARÍA E.; BELDOMÉNICO, H. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 142–151, 2013.

PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CRUZ, I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por cromatografia líquida de alta eficiência. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 37-44, 2003.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Argentina, v. 119, p. 15 - 24, 2015.

PISOSCHI, A.M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 97, p.55-74, 2015.

POPOVIC M. R.; THRASHER, T. A. Neuroprostheses. In: Bowlin, G. L.; Wnek, G. **Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering**. New York: Informa Healthcare, p. 1056-1065, 2004.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Environmental risk assessment of aquatic systems affected by pesticide use. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014.

REDDY, S.K.; HUSAIN, K.; SCHLORFF, E.C.; SCOTT, R.B.; SOMANI, S.M. Dose

response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. **Neurotoxicology**, v. 20, p. 977–987, 1999.

RIBEIRO, J.A. **Modelos de predição linear para a análise de sinais eletroencefalográficos (EEG) e de matrizes multieletrodo (MEA)**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

ROBERTS, J. R.; REIGART, J. R. **Recognition and management of pesticides poisonings**. EPA: Washington, 2013.

SALGADO COSTA, C.; RONCO, A. E.; TRUDEAU, V. L.; MARINO, D.; NATALE, G. S. Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables. **Environmental Pollution**, v. 235; p. 938-947, 2018.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p.1-16, 2001.

SOLOMON, K. R.; TAKACS, P. **Probabilistic risk assessment using species sensitivity distributions** In: Species Sensitivity Distributions in Risk Assessment. Boca Raton, p. 285–313, 2001.

SOTOMAYOR, V.; CHIRIOTTO, T.S.; PECHEN, A.M.; VENTURINO, A. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 119, p.48-53, 2015.

SENTHILKUMAR, K.; KANNAN, K.; SUBRAMANIAN, A.; TANABE, S. Accumulation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments, aquatic organisms, birds, bird eggs and bat collected from south India. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 8, p. 35-47, 2001.

UNIYAL, S.; SHARMA, R. K. Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: A review of status and prospects. **Biosensors and Bioelectronics**, v.116, p. 37-50, 2018.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for ecological risk assessment**. Washington, 1998. Disponível em: <<https://clu-in.org/download/contaminantfocus/sediments/ECOTXTBX.PDF>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Framework for Ecological Risk Assessment**. Washington, 1992. Disponível em: <https://rais.ornl.gov/documents/FRMWRK_ERA.PDF>. Acesso em: 10 jul. 2018.

VENESKY, M.D.; PARRIS, M.J.; STORFER, A. Impacts of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on tadpole foraging performance. **Ecohealth**, v. 6, p. 565–575, 2010.

WAGNER, N.; ZÜGHART, W.; MINGO, V.; LÖTTERS, S. Are deformation rates of anuran developmental stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 394-401, 2014.

WELLS, P.G.; BHULLER, Y.; CHEN, C.S.; JENG, W.; KASAPINOVIC, S.; KENNEDY, J.C.; KIM, P.M.; LAPOSA, R.R.; MCCALLUM, G.P.; NICOL, C.J.; PARMAN, T.; WILEY, M.J.; WONG, A.W. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2, p.354-366, 2005.

WIJESINGHE, M.R.; BANDARA, M.G.D.K.; RATNASOORIYA, W.D.; LAKRAJ, G.P. Chlorpyrifos induced toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) larvae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 690-696, 2011.

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

YIN, X. H.; JIANG, S. J.; YU, J.; ZHU, G. N.; WU, H. M.; MAO, C. L. Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 37, n. 3, p.1229-1235, 2014.

YIN, X. H.; ZHU, G. N.; LI, X. B.; LIU, S. Y. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v. 680, n. 1-2, p.2-6, nov. 2009.

YU, B. P. Cellular defense against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139–162, 1994.

ZIMATKIN, S. M.; PRONKO, S. P.; VASILIOU, V.; GONZALEZ, F. J.; DEITRICH, R. A. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, p. 1500–1505, 2006.

CAPÍTULO II

Alterações bioquímicas em larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a concentrações subletais dos inseticidas cipermetrina e fipronil

RESUMO

Inseticidas utilizados no ambiente terrestre para controle de pragas agrícolas e domésticas são uma constante ameaça a organismos aquáticos não alvo com importância ecológica. *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) é um anfíbio encontrado em fontes de água próximas a agroecossistemas e distribuído no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. Cipermetrina e fipronil são dois inseticidas amplamente utilizados no Brasil, porém, foram realizados poucos estudos para determinar seus efeitos em anfíbios. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de formulações comerciais a base de cipermetrina e fipronil em biomarcadores bioquímicos de neurotoxicidade e estresse oxidativo em *P. gracilis*. Foram testadas as formulações comerciais dos inseticidas, em larvas no estágio 25 de desenvolvimento de Gosner (1960) em teste crônico curto de 168 horas. As concentrações utilizadas variaram entre 1 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cipermetrina e 26 e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para fipronil, consideradas ambientalmente relevantes, baseadas na literatura. Foram analisados oito biomarcadores bioquímicos: AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, proteína carbonil e TBARS. Para cipermetrina houve aumento na atividade da AChE nas concentrações de 6 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e diminuição na concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para BChE e CAT ocorreu redução em todas as concentrações de cipermetrina. A atividade da SOD mostrou-se aumentada somente na concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e a GST aumentou a partir de 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para fipronil houve diminuição da atividade da AChE e BChE nas concentrações de 500 e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A atividade da SOD diminuiu a partir de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e da CAT foi aumentada em todas as concentrações. A GST apresentou um aumento a partir de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os níveis de proteínas carboniladas aumentaram para ambos os inseticidas em todas as concentrações. Para fipronil, houve diminuição dos níveis de TBARS a partir de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que para cipermetrina não ocorreram alterações. Tanto a formulação comercial de cipermetrina quanto a de fipronil demonstrou potencial de efeito neurotóxico e indução de dano oxidativo para a espécie. Os efeitos verificados indicam que é possível utilizá-los como biomarcadores para fins de monitoramento da toxicidade em anfíbios e para evitar que efeitos irreversíveis ocorram na sua população e no ecossistema.

Palavras-chave: Anfíbio. Piretróide. N-fenilpirazol. Neurotoxicidade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Insecticides used in the terrestrial environment to control agricultural and domestic pests are a constant threat to non-target aquatic organisms of ecological importance. *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) is an amphibian found in water sources near to agroecosystems and distributed in southern Brazil, Uruguay, Paraguay and Argentina. Cypermethrin and fipronil are two widely used insecticides in Brazil, but few studies have been carried out to determine their effects on amphibians. In this context, the aim of this study was to evaluate the toxicity of commercial formulations based on cypermethrin and fipronil on biochemical biomarkers of neurotoxicity and oxidative stress in *P. gracilis*. Commercial formulations of insecticides were tested in larvae at stage 25 of Gosner's development (1960) in a short chronic test of 168 hours. The concentrations used ranged from 1 to 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for cypermethrin and 26 and 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for fipronil, considered environmentally relevant, based on the literature. Eight biochemical biomarkers were determined: AChE, BChE, SOD, CAT, GST, NPSH, carbonyl protein and TBARS. For cypermethrin, there was an increase in AChE activity at concentrations of 6 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and a decrease in concentration of 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. For BChE and CAT, decrease was observed in all concentrations of cypermethrin. The activity of SOD was increased only at the concentration of 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and GST increased from 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. For fipronil, there was a decrease in AChE and BChE activity at concentrations of 500 and 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. SOD activity decreased from 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and CAT was increased at all concentrations. GST showed an increase from 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Carbonylprotein levels increased for both insecticides at all concentrations. For fipronil, there was a decrease in TBARS levels from 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ whereas for cypermethrin no changes occurred. Both the commercial formulation of cypermethrin and fipronil demonstrated the potential of neurotoxic effect and induction of oxidative damage to the species. The observed effects indicate that they can be used as biomarkers for the purpose of monitoring amphibian toxicity and to prevent irreversible effects on their population and ecosystem.

Keywords: Amphibian. Pyrethroid. N-phenylpyrazole. Neurotoxicity. Oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são utilizados mundialmente na agricultura com a função de proteger culturas de pragas, plantas daninhas, patógenos e parasitas (NAQVI; SHOAIB; ALI, 2016). A expansão agrícola em conjunto com o uso crescente de agrotóxicos contribuiu para presença de agrotóxicos em vários compartimentos ambientais, sendo o ambiente aquático um dos mais afetados (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; NAQVI; SHOAIB; ALI, 2016). Inseticidas são agrotóxicos utilizados para o combate de muitos tipos de insetos e podem ser encontrados em águas superficiais (STEHLER; SCHULZ, 2016). No Brasil, concentrações de $1\mu\text{g.L}^{-1}$, $3\mu\text{g.L}^{-1}$ (BELLUTA *et al.*, 2010) e $20\mu\text{g.L}^{-1}$ (CARLOS *et al.* 2011) do inseticida cipermetrina foram encontradas em água superficial, bem como concentrações variando de 0,05 a $26,2\mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida fipronil (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Cipermetrina (cyano-(3-phenoxyphenyl)methyl]3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate) (Figura 1), fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$, é um inseticida piretróide sintético tipo II empregado para controle de pragas agrícolas e domésticas há 40 anos (KAISAREVIC *et al.*, 2019), sendo um dos inseticidas mais utilizados no mundo (ULLAH *et al.*, 2018) e no Brasil (IBAMA, 2018). É classificado como altamente tóxico (Classe II) em termos de toxicologia e empregado em culturas de arroz, batata, café, citrus, feijão, fumo, mandioca, milho, soja e tomate (ANVISA, 2018), bem como para controle de ectoparasitas, insetos e tratamento de madeiras (VELISEK *et al.*, 2006).

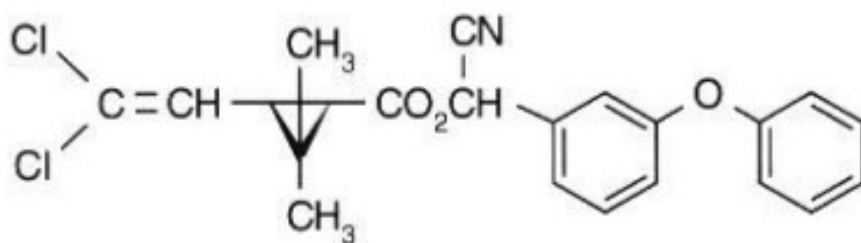


Figura 1 - Fórmula estrutural da cipermetrina. **Fonte:** ANVISA, 2018.

Piretróides são inseticidas potentes e seletivos (MORETTO, 2018), associados a impactos ambientais, especialmente no que tange à toxicidade

para organismos não alvo como abelhas (BOVI, 2013; DEL SARTO *et al.*, 2014), artrópodes aquáticos (GRISOLIA, 2005), peixes (MONTANHA; PIMPÃO, 2012), anfíbios (AYDIN-SINAN; GÜNGÖRDÜ; OZMEN, 2012; MACAGNAN *et al.*, 2017; WRUBLEWSKI *et al.*, 2018) e mamíferos (KANEKO, 2011).

Piretróides são formulados a partir de vegetais do gênero *Chrysanthemum* e são separados em dois grupos, piretróides I – sem o grupo α -ciano na porção álcool e piretróides II – com o grupo α -ciano na porção álcool, caso da cipermetrina (SODERLUND *et al.*, 2002). Piretróides atuam alterando a permeabilidade dos canais de sódio voltagem-dependente das células nervosas (SODERLUND *et al.*, 2002; BRADBURY *et al.*, 2008). Concentrações de íons de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloro (Cl^-) influenciam na transmissão do impulso nervoso, contudo, a propagação dos estímulos nervosos de uma célula a outra é dependente de neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e acetilcolina (DOWSON, 1977). Piretróides I atuam prolongando a abertura do canal de sódio, fazendo com que ocorra maior influxo de sódio na célula e provocando repetidos potenciais de ação, já piretróides II, como a cipermetrina, retardam o fechamento do canal para o estado inativado, gerando várias despolarizações (SODERLUND *et al.*, 2002; BRADBURY *et al.*, 2008). Este fenômeno propicia despolarização da membrana, descargas repetitivas e distúrbios sinápticos que geram hiperexcitabilidade (NARAHASHI, 1996; SODERLUND *et al.*, 2002).

O fipronil ((RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfenylpyrazole-3-carbonitrile) (Figura 2), pertencente a classe n-fenilpirazol é outro inseticida amplamente utilizado no Brasil (IBAMA, 2018) e um dos mais encontrados em águas doces brasileiras (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Consiste em uma alternativa para controle de insetos resistentes ou tolerantes a piretróides, organofosforados e carbamatos (WARE; WHITACRE, 2004). É empregado no controle de pragas para jardins e culturas agrícolas como algodão, arroz, batata, cevada, feijão, soja, milho, cana-de-açúcar, trigo e pastagens (EPA, 1996; MOHAMED *et al.*, 2004), bem como para animais domésticos, no combate a pulgas e carrapatos (ROBERTS; REIGART, 2013). Este inseticida classifica-se como classe II, sendo altamente tóxico em termos de toxicologia e muito perigoso ao meio ambiente (ANVISA, 2017).

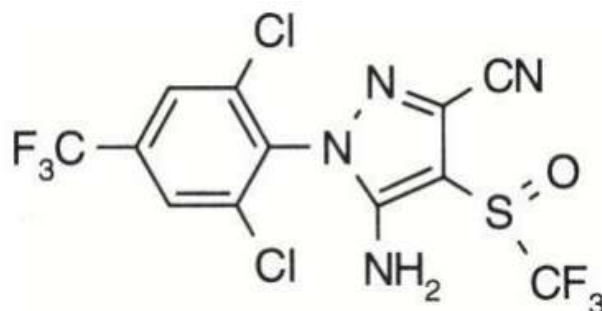


Figura 2 - Fórmula estrutural do fipronil. **Fonte:** ANVISA, 2017.

Durante a degradação do fipronil ocorre a formação de outro metabólito tóxico denominado disulfenil. Este em contato com a luz solar possui ação neurotóxica similar a molécula de fipronil (BOBÉ *et al.*, 1998). Embora o fipronil apresente baixa volatilidade e solubilidade em água e, estabilidade a temperatura ambiente, possui alta toxicidade para organismos aquáticos, aves e insetos (GUNASEKARA; TROUNG, 2007). Em virtude de sua toxicidade e uma possível relação com a mortalidade de abelhas, o uso deste inseticida está proibido na França desde 2004 (OLIVEIRA, 2010; CHAGURI, 2016).

No sistema nervoso central a transmissão do impulso nervoso ocorre devido a diferença de concentração de íons dentro e fora das células e, o equilíbrio iônico é dependente de reguladores neuronais como o ácido gama amino butírico (GABA) (WIRTH *et al.*, 2004). O GABA (presente em vertebrados e invertebrados) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central que modula a atividade de vários neurotransmissores (BALDESSARINI, 1996; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2005). O fipronil foi desenvolvido para atuar inibindo de forma não-competitiva o receptor GABA associado a canais de cloro em insetos (MARTINS, 2009; ROBERTS; REIGART, 2013). O inseticida fixa-se na porção interna deste receptor ionotrópico, inibindo o influxo celular dos íons cloro e anulando o seu efeito neurorregulador, resultando em atividade neural excessiva. A excitação na atividade neural causa paralisia e, posteriormente morte do organismo exposto (CHAGURI, 2016). Quanto a organismos vertebrados, seu mecanismo de ação ainda não é compreendido totalmente, contudo, seu mecanismo de toxicidade pode ser explicado por algumas reações biológicas como indução de enzimas de biotransformação, como citocromo P450 1A e estresse oxidativo (ARDESHIR *et al.*, 2018).

Anfíbios possuem ciclo de vida bifásico, estando suscetíveis a contaminação por agrotóxicos tanto no estágio aquático quanto terrestre (BRANDÃO *et al.*, 2011). Além disso, o desenvolvimento larval de anfíbios geralmente ocorre em pequenos corpos d'água onde as concentrações de contaminantes podem estar mais elevadas (HARTEL; VON WEHRDEN, 2013; MARGARIDO *et al.* 2013). Isto reforça a necessidade de estudos acerca dos efeitos dessas substâncias na preservação das espécies e do seu habitat (LAJMANOVICH *et al.*, 2014; MARGARIDO *et al.*, 2011; MARGARIDO *et al.*, 2013; BOSCOLO *et al.*, 2017; GRIPP *et al.*, 2017; WRUBLESWSKI *et al.*, 2018).

Physalaemus gracilis (Anura: Leptodactylidae), popularmente conhecida como rã chorona, é uma espécie de anfíbio amplamente distribuída no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (FROST, 2018). A espécie é encontrada em fontes de água próximas a agroecossistemas (LAVILLA *et al.* 2010) podendo estar vulnerável aos agrotóxicos. Essa espécie já foi estudada para avaliar a toxicidade de cipermetrina e atrazina e pode ser considerada um bom bioindicador dos efeitos de agrotóxicos (MACAGNAN *et al.*, 2017; STURZA, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018). Estudos apontam que os piretróides podem ser neurotóxicos para anfíbios (MACAGNAN *et al.*, 2017; LAJMANOVICH *et al.*, 2018; WRUBLEWSKI *et al.*, 2018) e que o fipronil pode causar dano oxidativo (MARGARIDO *et al.*, 2013; GRIPP *et al.*, 2017; BOSCOLO *et al.*, 2017). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a toxicidade de formulações comerciais a base de cipermetrina e fipronil em biomarcadores bioquímicos para avaliar o potencial neurotóxico e de dano oxidativo em larvas de *P. gracilis*.

2 METODOLOGIA

2.1 AGROTÓXICO

Os agrotóxicos testados foram as formulações comerciais dos inseticidas Terra Forte® (250 g/L i. a. fipronil e 890 g/L de ingredientes inertes) e Cypren 250 CE (250 g/L i. a. cipermetrina e 723 g/L de outros ingredientes). A solução-estoque foi feita no dia da realização dos ensaios crônicos. Para isso, foi realizada a diluição da formulação comercial em água destilada até

obter uma solução-estoque com concentração de 500 mg.L⁻¹ que foi utilizada em todos os ensaios de toxicidade. Os ensaios de toxicidade foram realizados dentro do tempo de meia-vida de cipermetrina (superior a 50 dias (JONES, 1995; KAMRIN, 1997)) e fipronil (superior a 100 dias em condições de pH entre 5,5 e 7,0 (GUNASEKARA *et al.*, 2007)) para a água.

Cipermetrina é estável a fotólise, com uma meia vida superior a 100 dias (JONES, 1995; KAMRIN, 1997). Em pH neutro e ácido, os piretróides tendem a permanecer estáveis, contudo, a hidrólise pode aumentar em pH alcalino (LASKOWSKI, 2002). Além disso, possui densidade de 1,12 g/mL a 22°C, ponto de fusão de 60-80°C (isômeros puros) (HAYES; LAWS, 1990), ponto de ebulição de 170-195°C (EPA, 1989) e pressão de vapor de 4x10⁻⁸ mm Hg a 70°C (HAYES; LAWS, 1990).

O fipronil possui densidade de 1,62 g/mL a 20°C (TINGLE *et al.*, 2003), solubilidade em água de 1,9 mg/L em pH 5 e, 2,4 mg/L em pH 9 a 20°C, ponto de fusão de 195,5 - 203°C e pressão de vapor de 2,8x10⁻⁹ mm Hg a 25°C (JACKSON *et al.*, 2009). O composto original pode passar por reações de fotólise, hidrólise, oxidação e redução, formando produtos que podem ser mais tóxicos na natureza comparado a composição inicial (GUSESEKARA *et al.*, 2007).

2.2 ORGANISMO-TESTE

Desovas totais de *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae) foram coletadas no lago da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - campus Erechim – RS (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste) com menos de 24 horas de oviposição, de acordo com Gosner (1960).

No laboratório, as desovas foram dispostas em aquários de 15 litros, em água de poço artesiano livre de cloro (analisada previamente e atendendo os padrões de potabilidade), em condições controladas de laboratório. Os parâmetros da água usada nos aquários, controle e tratamentos foram: 24°C (± 1); pH de 7,0 (± 0,5), oxigênio dissolvido de 5 (± 1) mg.L⁻¹, turbidez < 5, condutividade de 160 (± 10) µS/cm, alcalinidade de 9,74 mgCaCO₃.L⁻¹, sódio de 44,1 mg.L⁻¹, magnésio de 1,35 mg.L⁻¹, ferro de 0,08 mg.L⁻¹ e níquel menor que 0,001mg/L. A sala foi aclimatada com a temperatura entre 25°C (± 2) e com

umidade relativa do ar entre 60 e 80% e, iluminação controlada (12/12 horas claro-escuro). Os indivíduos foram alimentados com ração comercial para peixes (Alcon Basic), em flocos e com 45% de proteína bruta. Os animais excedentes foram devolvidos a natureza, no mesmo local de coleta das desovas.

Para realização deste estudo, obteve-se licença do ICMBio nº 54939-1 e autorização do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (23205.003635/2017-14).

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O ensaio subletal ou crônico foi realizado com larvas no estágio de desenvolvimento 25 de Gosner (1960) e teve duração de 168 horas (7dias), considerado ensaio crônico de curta duração, de acordo com ASTM STP 1443 (HERKOVITS; PEREZ-COLL, 2003).

Foram utilizadas dez larvas dispostas em recipiente de vidro contendo 500 mL de solução com a concentração subletal dos inseticidas, com 6 réplicas, totalizando 60 larvas para cada tratamento. O controle foi realizado no mesmo delineamento, sem adição do agrotóxico na água. Os recipientes foram selados para evitar a volatilização do produto e foram mantidos com aeração constante, a fim de garantir as mesmas condições da aclimação das desovas (temperatura da água: $24 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ e concentração de oxigênio: $5 (\pm 1) \text{ mg.L}^{-1}$).

Para cipermetrina, foram testadas quatro concentrações encontradas em águas superficiais consideradas ambientalmente relevantes: $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BELLUTA *et al.*, 2010), $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BELLUTA *et al.*, 2010), $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ETCHEGOYEN *et al.*, 2017) e $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CARLOS *et al.*, 2011) e uma concentração intermediária entre 6 e $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$). Para o fipronil, foi testada a concentração mais alta detectada em água superficial brasileira ($26 \mu\text{g.L}^{-1}$) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016), 50 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ que podem ser encontradas na natureza e já foram testadas em *Scinax fuscovarius* (MARGARIDO *et al.*, 2013) e, 500 e $1500 \mu\text{g.L}^{-1}$ testadas em *Eupemphix nattereri* (MARGARIDO *et al.*, 2011). Essas concentrações de fipronil foram escolhidas devido à escassez de estudos demonstrando concentrações do inseticida no habitat de anfíbios brasileiros. De acordo com Margarido *et al.*

(2013), larvas de anfíbios podem desenvolver-se em lagos próximos de áreas agrícolas e nesses locais pode haver concentrações de agrotóxico maiores do que em rios e lagoas (onde a diluição do agrotóxico é maior). Ainda segundo os autores, em lagoas a concentração também pode ser aumentada devido a evaporação da água após longos períodos sem precipitação.

Foi realizado monitoramento da mortalidade a cada 24 horas e ao final das 168 horas, as larvas foram congeladas (-20°C), e transportadas para o Laboratório de Toxicologia Aquática da UFSM, para análises de biomarcadores bioquímicos.

2.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As larvas foram homogeneizadas inteiras (*pool* de 50 mg) em 1 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi reservado, mantido em microtubos a -20°C e utilizado para todas as análises bioquímicas (testadas em duplicata).

2.4.2. ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A atividade da AChE foi determinada de acordo com Ellman *et al.* (1961) com algumas modificações, em microplaca. As alíquotas de sobrenadante (10 µL) foram pré-incubadas a 30°C durante 2 minutos em uma solução (33 µL) contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (1 mM). Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 33 µL do substrato acetilcolina (ASCh) 1 mM. A atividade foi verificada a 412 nm a cada 30 segundos, durante 2 minutos e 30 segundos e expressa em µmol de ASCh hidrolisado/min/mg de proteína.

2.4.3. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)

A atividade de BChE foi verificada pelo método descrito por Ellman *et al.* (1961) com algumas modificações. As microplacas contendo amostras (10 µL) foram pré-incubadas a 30°C durante 2 minutos em uma solução contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5) e DTNB 1 mM. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 33 µL do substrato butirilcolina

(BTC) 20 nM. A atividade foi verificada a 412 nm, durante 5 minutos e expressa em μmol de BTC hidrolisado/min/mg de proteína.

2.4.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade GST foi determinada por uma modificação do procedimento descrito por Habig *et al.* (1974). Em uma microplaca foram adicionados 10 μl de amostra, 150 μl de tampão fosfato de potássio (20 mM, pH 6,5), 50 μl de glutathiona reduzida (GSH) e 50 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). 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.

2.4.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade de SOD foi determinada pelo método de Misra e Fridovich (1972) com algumas modificações. O ensaio foi realizado em microplacas onde foram pipetados 5, 10, 15 e 20 μL de amostra, e 190, 185, 180 e 175 μl de tampão glicina, respectivamente (50 mM, pH 10,6 - mantido a 37°C em banho-maria) e 5 μL de adrenalina (60 mM). Este método baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. Uma unidade de SOD corresponde a quantidade da enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação da adrenalina. A absorbância foi determinada em modo cinético a 480 nm durante 10 minutos. A atividade da SOD foi expressa em UI SOD/mg de proteína.

2.4.6 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método de Nelson e Kiesow (1972), em cubeta. A mistura de ensaio consistiu em 1000 μl de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), 10 μl de amostra e 50 μl de H_2O_2 (0,3 M). A mudança de absorbância devido ao consumo do H_2O_2 pela catalase foi medida a 240 nm durante 10 minutos. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

2.4.7 NÍVEIS DE TIOIS NÃO PROTEICOS

Os níveis de tiois não proteicos foram determinados por uma modificação do método de Ellman (1959). Inicialmente o homogeneizado foi desproteinizado com ácido tricloroacético (TCA) 10% (1:1). Em microplaca, 30 µl do sobrenadante desproteinizado, 100 µL de tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e 10 µl de DTNB (10 mM) foram pipetados. Após incubação no escuro durante 20 minutos, a absorbância foi medida a 412 nm. Os níveis de tiois não proteicos foram expressos como µmol SH/g de tecido.

2.4.8 NÍVEIS DE PROTEÍNA CARBONIL

Os níveis de proteína carbonilada foram verificados pelo método de Yan *et al.* (1995) com algumas modificações. No ensaio, 200 µL de amostra foram misturados a 800 µl de água destilada, 150 µl de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (10 mM) dissolvida em ácido clorídrico (2N). A mistura foi incubada no escuro, em temperatura ambiente, durante 60 min. Após, foram adicionados sequencialmente: 125 µL de tampão fosfato de sódio (150 mM, pH 6,8) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) 3%, 500 µL de etanol (99,8%) e 500 µL de heptano (99,5%). Essa mistura foi agitada em vórtex durante 30 segundos e após, centrifugada a 3000 x g durante 15 minutos. Na sequência, a proteína isolada a partir da interface foi lavada por ressuspensão em etanol/acetato de etila (1:1). Em seguida, foi adicionado 250 µL de tampão desnaturante (SDS 3%) e 200 µL da mistura foram pipetados em uma microplaca. Para cada amostra foi incluído um branco incubado com HCl (2N) sem DNPH. A absorbância foi medida a 370 nm. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 22.000 M/cm. O conteúdo de proteína carbonil foi expresso como nmol de proteína carbonilada/mg de proteína.

2.4.9 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi medida através da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com método de Buege e Aust (1978) com algumas modificações. 50 µL de amostra foi misturada com 50 µL de TCA 10%, seguido por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos. 100 µl de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,67% foram adicionados a 30 µl do sobrenadante e incubados a 100°C, durante 30 minutos. A absorbância foi

medida em um leitor de microplacas a 532 nm. O malondialdeído (MDA) foi usado como padrão e a peroxidação lipídica foi expressa em nmol de MDA/mg proteína.

2.4.10 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) Coomassie Blue utilizando albumina de soro bovino como padrão. A absorbância da amostra foi medida a 595 nm.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram testados quanto a normalidade pelo método de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade por Bartlett. Os resultados foram analisados utilizando-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre todos os tratamentos, utilizando-se o *software GraphPad Prism*, versão 7.00. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) entre tratamentos e controle.

3 RESULTADOS

3.1 TOXICIDADE CRÔNICA

3.1.1 MORTALIDADE

Não houve influência da concentração dos inseticidas ($F_{cip\ 5,30} = 1,50$; $p = 0,21$; $F_{fip\ 5,30} = 2,24$; $p = 0,07$) e do tempo de exposição ($F_{cip\ 6,35} = 0,58$; $p = 0,74$; $F_{fip\ 6,35} = 1,85$; $p = 0,11$) na mortalidade das larvas de *P. gracilis* (Tabela 1 e Figura 3), quando comparado ao controle.

Tabela 1 - Mortalidade das larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a concentrações subletais da formulação comercial de cipermetrina (CIP) (1-20 µg.L⁻¹) e fipronil (FIP) (26 – 1500 µg.L⁻¹) ao longo de 168 horas.

Agrotóxico	Concentração µg.L ⁻¹	Mortalidade							Total	Total (%)
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h		
CIP	0	1	0	1	1	0	0	0	3	1,8
	1	2	1	1	2	3	5	3	17	10,2
	3	4	6	0	1	0	1	3	15	9
	6	1	1	3	3	3	1	2	14	8,4
	10	0	0	4	1	1	0	6	12	7,2
	20	1	0	4	1	2	3	3	14	8,4
FIP	0	2	1	0	0	0	0	1	4	8,3
	26	1	0	0	1	5	3	1	11	18,3
	50	1	0	1	0	2	2	7	13	21,7
	100	0	1	3	3	2	4	1	14	23,3
	500	3	3	1	2	0	4	4	17	28,3
	1500	2	1	0	4	2	4	2	15	25,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

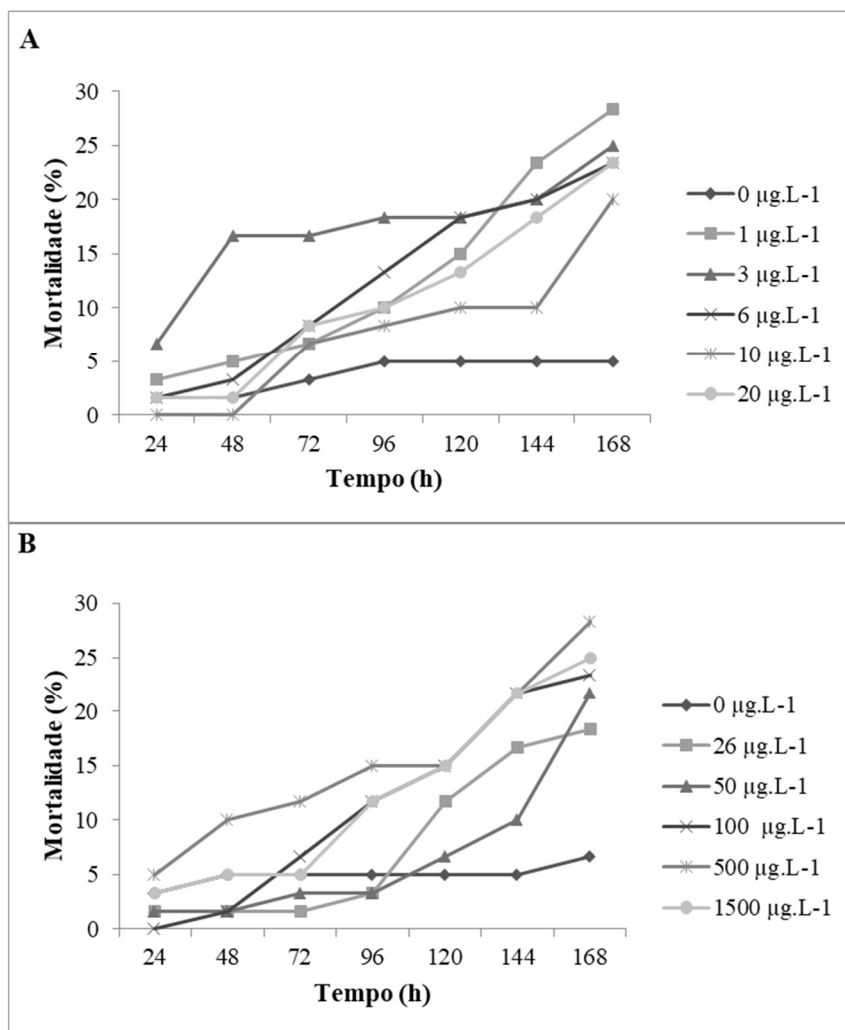


Figura 3 - Mortalidade cumulativa (%) de larvas de *Physalaemus gracilis* expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina (A) e fipronil (B) durante o ensaio crônico. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

3.1.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Após 168 horas de exposição a formulação comercial de cipermetrina não houve alteração da atividade da AChE nas larvas expostas a 1 e 3 µg.L⁻¹, em relação ao controle. Porém, houve ativação de 25,66% e 29,67% nas concentrações de 6 e 10 µg.L⁻¹, respectivamente e, inibição de 31,12% na concentração de 20 µg.L⁻¹, todas em relação ao controle (Figura 4A). Para o inseticida fipronil houve inibição na atividade da AChE de 53,10% e 40,03% nas concentrações de 500 e 1500 µg.L⁻¹, respectivamente (Figura 4B), em relação ao controle.

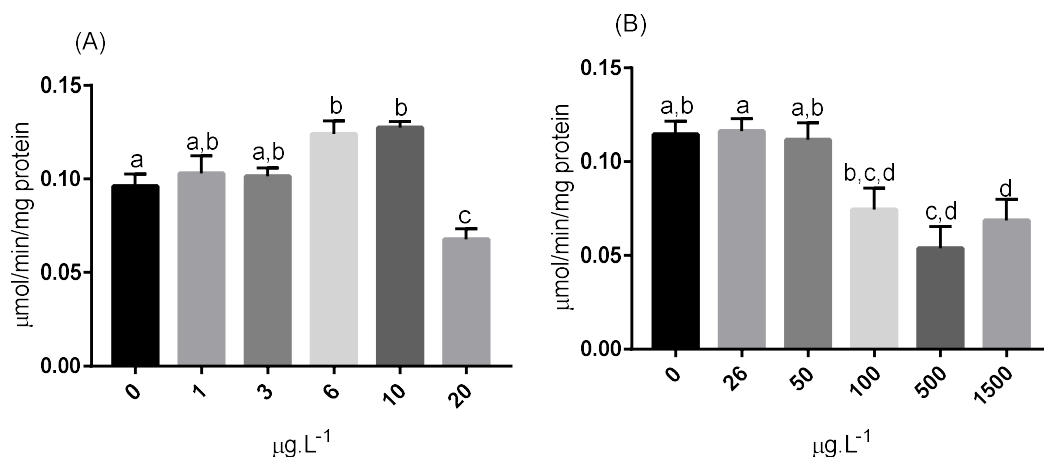


Figura 4 - Atividade da enzima AChE em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Para a BChE houve inibição significativa da atividade em relação ao controle em todas as concentrações de cipermetrina. A inibição em $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi de 35,75%, em $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 35,89%, em $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 30,42%, em $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 28,28% e em $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 33,30% (Figura 5A). Para fipronil houve inibição em relação ao controle na atividade da BChE, correspondendo a 37,73% e 38,16% nas concentrações de 500 e $1500 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 5B), respectivamente.

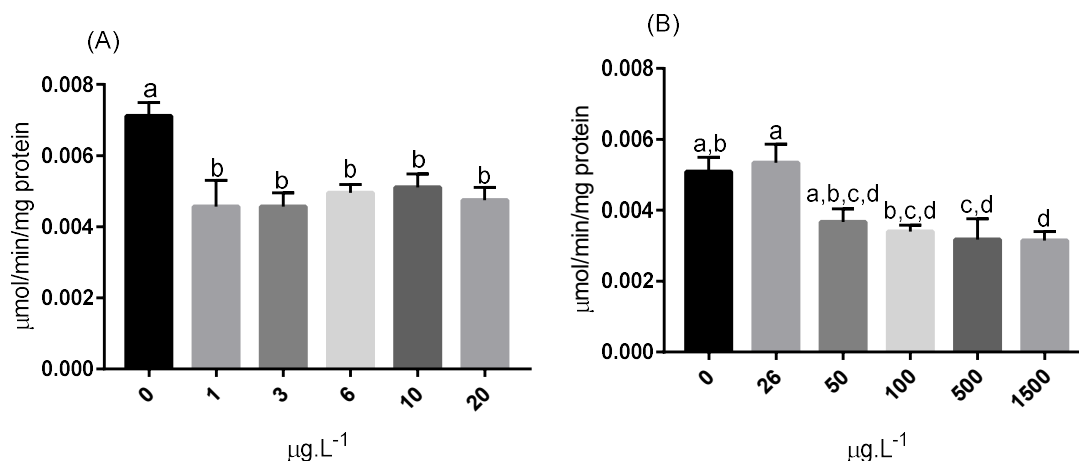


Figura 5 - Atividade da enzima BChE em larvas de *Physalaemus gracilis* após exposição de 168 horas a cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

A atividade da enzima SOD mostrou-se aumentada a partir da concentração de $3 \mu\text{g.L}^{-1}$, porém, a ativação (59,29%) foi significativa em relação ao controle somente na concentração de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 6A). Para o

fipronil (Figura 6B), com exceção da concentração de 26 $\mu\text{g.L}^{-1}$, houve inibição significativa da atividade da SOD em relação ao controle, sendo 27,28% em 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 38,42% em 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 43,85% em 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 42,20% em 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

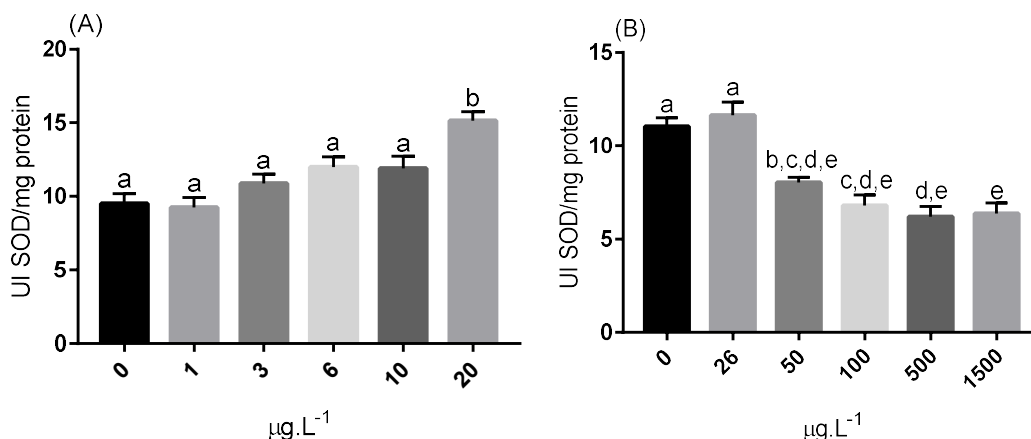


Figura 6 - Atividade da enzima SOD em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Após 168 de exposição houve inibição na atividade da CAT (Figura 7A) em relação ao controle para todas as concentrações de cipermetrina, sendo 28,57% em 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 34,52% em 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 36,90% em 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 28,57% em 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 36,90% em 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para o fipronil (Figura 7B) ocorreu o contrário, houve ativação em todas as concentrações em relação ao controle, sendo 54,06% em 26 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 43,39% em 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 84,54% em 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 70,92% em 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 55,70% em 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

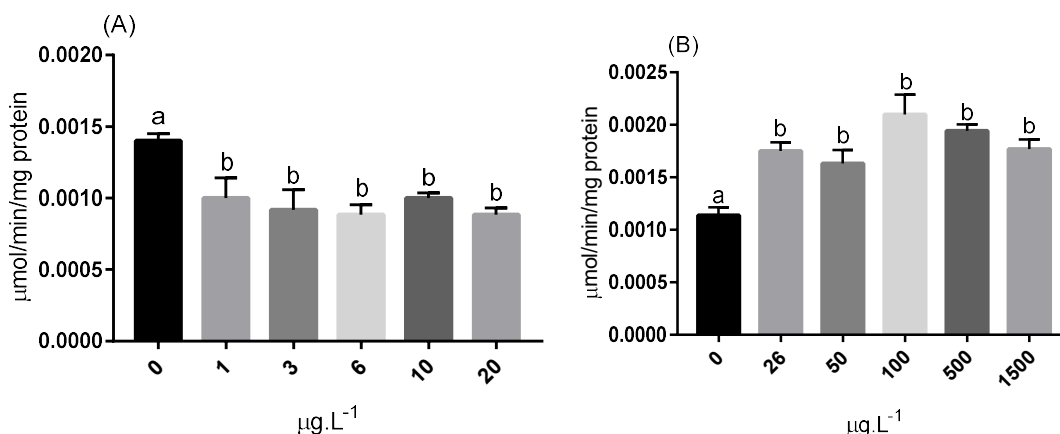


Figura 7 - Atividade da enzima CAT em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Em relação a enzima GST, para cipermetrina (Figura 8A) houve ativação da atividade de 48,66% em 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 29,37% em 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 29,78% em 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em relação ao controle. Para fipronil ocorreu ativação em relação ao controle apenas nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (32,22%), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (49,65%), 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (34,43%) e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (41,55%) (Figura 8B).

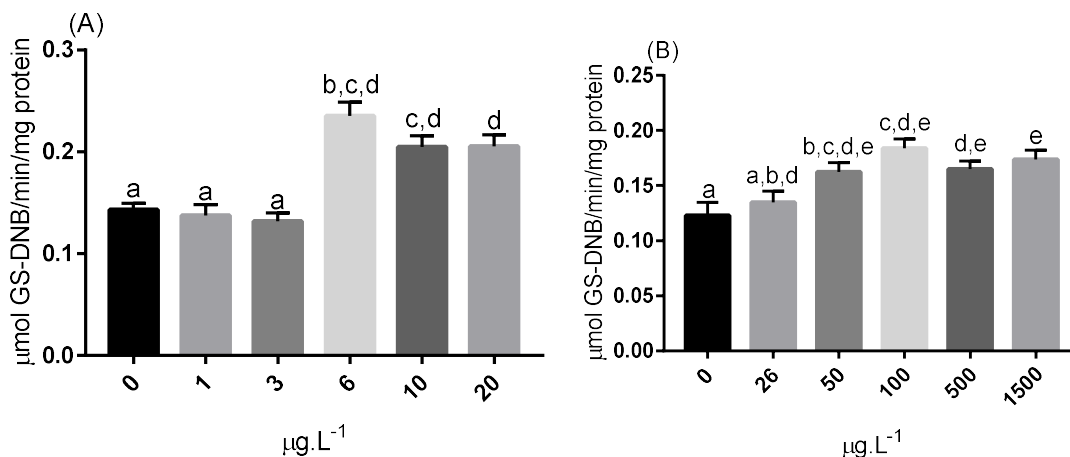


Figura 8 - Atividade da enzima GST em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Os níveis de tióis não proteicos das larvas não sofreram alterações significativas após a exposição a cipermetrina e fipronil em qualquer concentração (Figura 9A e B).

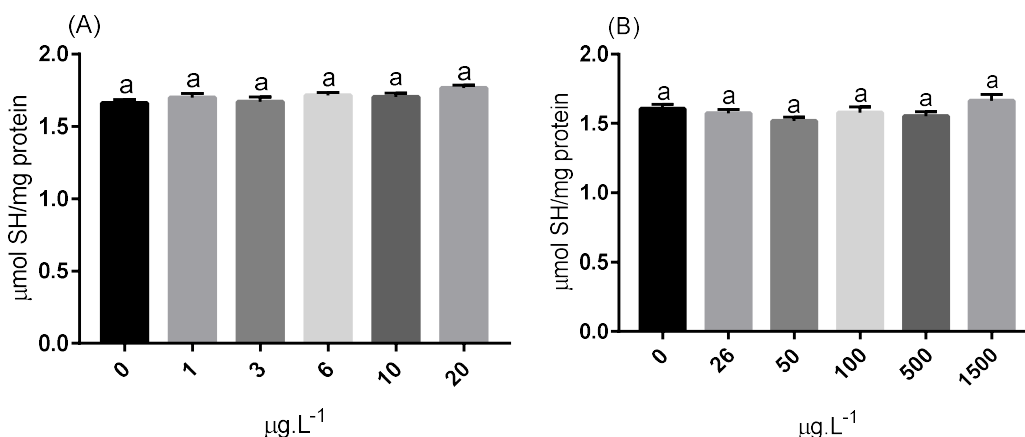


Figura 9 - Níveis de tióis não proteicos (NPSH) em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Os níveis de proteínas carboniladas aumentaram para ambos os inseticidas em todas as concentrações. Para cipermetrina (Figura 10A), houve aumento em relação ao controle nas concentrações de 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (46,27%), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (47,76%) e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (153,09%) e para fipronil (Figura 10B) em 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (62,03%), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (125,40%), 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (140,89%) e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (128,91%).

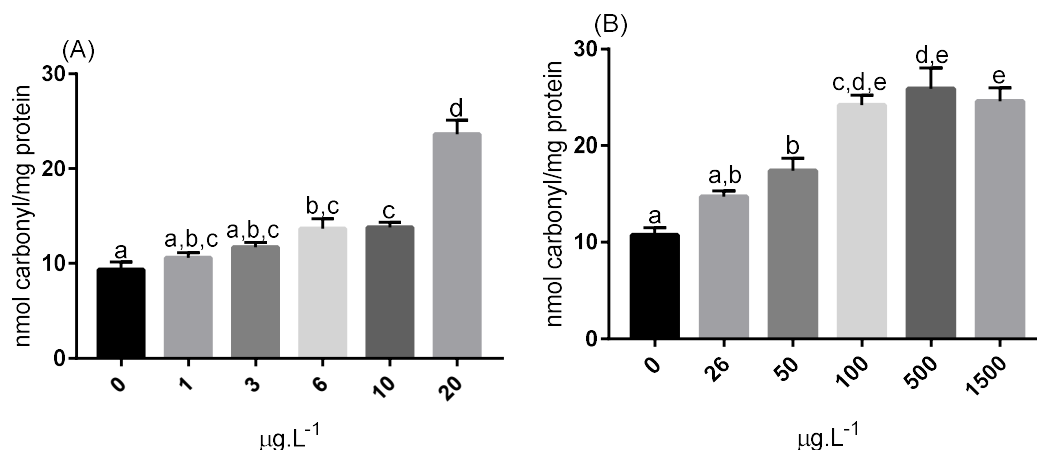


Figura 10 - Níveis de proteína carbonil em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

Não houve diferença nos níveis de dano lipídico (TBARS) entre o controle e as concentrações de cipermetrina (Figura 11A). Para fipronil (Figura 11B), houve diminuição significativa dos níveis em 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (37,50%), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (36,00%), 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (38,29%) e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (39,32%).

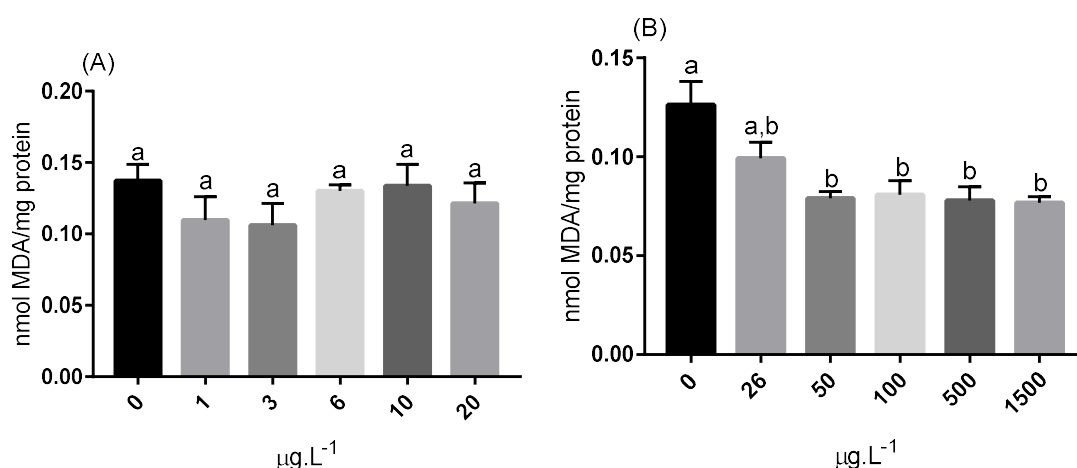


Figura 11 - Níveis de TBARS em larvas de *Physalaemus gracilis* após 168 horas de exposição a diferentes concentrações de cipermetrina (A) e fipronil (B). Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pela autora, 2018.

4 DISCUSSÃO

Tanto cipermetrina quanto fipronil causaram baixa mortalidade para larvas de *P. gracilis* durante sete dias nas concentrações testadas. Contudo, para cipermetrina estudos indicam que esta resposta pode variar em função da formulação comercial e espécie estudada, como observado em larvas de *Physalaemus cuvieri* com taxa de mortalidade variando de 23 a 53% (WRUBLESWSKI *et al.*, 2018) e em *P. gracilis* com mais 70% em concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (VANZETTO, 2016). Para formulações de fipronil, a baixa mortalidade ou nula foi relatada em *Scinax fuscovarius* em concentrações variando de 200 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MARGARIDO *et al.*, 2011) e para *Physalaemus nattereri* em concentrações de 500 a 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (BOSCOLO *et al.*, 2017).

Os piretróides são altamente tóxicos para organismos não-alvo devido a sua característica lipolífica, que facilita a absorção por membranas e tecidos biológicos (BIGA; BLAUSTEIN, 2013). A exposição crônica a cipermetrina em *P. gracilis* provocou um aumento da atividade da AChE nas concentrações mais baixas, 6 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto a dose máxima estudada de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, promoveu uma inibição da atividade desta enzima. Este resultado é característica de uma resposta bifásica, onde o estímulo na concentração baixa é uma resposta do organismo para manter a homeostase celular (CALABRESE; BLAIN, 2011; CALABRESE, 2015).

Apesar de ter ocorrido ativação, piretróides podem inibir a AChE através de ligação com o seu sítio ativo (BÁLINT *et al.*, 1995) ou modificação da sua estrutura (RAO; RAO, 1995; KHAZRI *et al.*, 2016). A inibição da atividade da AChE observada em larvas de *P. gracilis* expostas a concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina pode estar associada a interação hidrofóbica do inseticida com a parte hidrofóbica da superfície aromática da enzima (RAO; RAO, 1995; KHAZRI *et al.*, 2016). Redução na atividade da AChE implica em acúmulo do neurotransmissor acetilcolina que ocasiona efeitos neurotóxicos graves como redução da transmissão colinérgica (MILESON *et al.*, 1998), que promove por sua vez, alterações comportamentais, fisiológicas, bem como distúrbios locomotores e morte (REDDY *et al.*, 1992; WHEELLOCK *et al.*, 2005).

A BChE auxilia na eliminação de compostos anticolinesterásicos, protegendo a AChE da ação dessas substâncias (YANG *et al.*, 2013). A inibição de BChE em *P. gracilis* nas concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina pode ter relação com esse mecanismo, visto que, não houve inibição da AChE nessas concentrações. Porém, na concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina, a BChE por estar inibida não foi capaz de proteger a AChE que acabou inibida também. Inseticidas piretróides geralmente inibem as enzimas colinesterases (SOGORB; VILANOVA, 2002; WHEELLOCK *et al.* 2004). Isto foi relatado por: Attademo *et al.* (2011), onde rãs adultas de *Leptodactylus chaquensis* coletadas em áreas próximas a plantações de arroz, com presença de piretróides, apresentaram inibição da enzima BChE; Marigoudar *et al.*, (2009) em peixes *Labeo rohita* (Hamilton) expostos em laboratório ao ingrediente ativo cipermetrina por 14 dias; e Korkmaz *et al.*, (2018) no peixe *Danio rerio* exposto a uma formulação comercial de cipermetrina por 96 horas.

A inibição da AChE e BChE nas larvas de *P. gracilis* expostas as concentrações mais altas de fipronil mostra que a BChE não foi capaz de exercer função protetora para a AChE. Resultados similares de inibição da AChE foram observados por Menezes *et al.* (2016) nos peixes *Cyprinus carpio* e *Rhamdia quelen* após exposição a uma formulação comercial de fipronil.

As enzimas antioxidantes SOD e CAT atuam em sinergismo para regular os níveis de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxidos (H_2O_2) (REDDY *et al.*, 1999; ZIMATKIN *et al.*, 2006; HIPÓLITO *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ *et al.*, 2016) e podem ser aumentadas ou inibidas em situações de estresse químico (CLASEN *et al.*, 2014). A SOD é a primeira enzima a atuar contra radicais livres, apresentado maior resposta ao estresse oxidativo (CLASEN *et al.*, 2014). O aumento na atividade da SOD encontrado em *P. gracilis* exposto a concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina indica que essa concentração promoveu maior formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, a ativação foi necessária para proteger as células dos danos dos radicais livres. No entanto, para a CAT houve inibição da atividade em todas as concentrações de cipermetrina testadas, mostrando que este piretróide pode afetar essa enzima e que as células podem ter sido danificadas devido a redução da hidrólise de H_2O_2 por essa defesa antioxidante. A redução na atividade da CAT também pode estar associada ao

fluxo de radicais superóxido, que são inibidores da enzima e causam ruptura no sistema antioxidante (MONTEIRO *et al.*, 2006). A diminuição na atividade da CAT é uma resposta comum a intoxicação por agrotóxicos e também foi registrada no fígado do peixe *Channa punctatus* após 48 horas de exposição ao piretróide deltametrina (SAYEED *et al.*, 2003).

Em larvas de *P. gracilis* expostas a fipronil, ocorreu o contrário em relação a SOD e CAT, se comparada as expostas a cipermetrina. A inibição da atividade da SOD a partir da concentração de 50 µg.L⁻¹ mostrou que essa defesa antioxidante foi incapaz de proteger as células do radical O₂⁻. Além disso, a SOD pode ter sido inibida pela presença da elevada quantidade H₂O₂ (SAMPSON; BECKMAN, 2001), comprovada pelo aumento da atividade da CAT nas larvas em todas as concentrações de fipronil. Apesar de normalmente as enzimas SOD e CAT atuarem em sinergismo, isso não ocorreu em larvas de *P. gracilis* após exposição ao fipronil. O aumento da CAT pode ser reflexo da toxicidade do xenobiótico que causa aumento de EROS (JOHN *et al.*, 2001) e indica um aumento nos processos de detoxificação para evitar danos a biomoléculas. Essa resposta corrobora com observações registradas em *Daphnia magna* a qual apresentou aumento da CAT após exposição aos inseticidas clorantniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide (CUI *et al.*, 2017) e no anfíbio *Rhinella arenarum* exposto a clorpirifós (SOTOMAYOR *et al.*, 2015).

A enzima GST atua em processos de detoxificação na fase II da biotransformação, onde compostos exógenos são conjugados com macromoléculas endógenas (MARGARIDO *et al.*, 2013) com a finalidade de tornar os xenobióticos mais hidrofílicos e facilitar a excreção (SHEEHAN *et al.*, 2001). A ativação da GST nas concentrações mais altas de cipermetrina e fipronil demonstram que as larvas de *P. gracilis* tentaram reverter o efeito de ambos os inseticidas, aumentando os processos de detoxificação para manter a integridade dos processos celulares. Resultados semelhantes ocorreram em larvas do anfíbio *Scinax fuscovarius* (MARGARIDO *et al.*, 2013) e no peixe *Rhamdia quelen* expostos a fipronil (MENEZES *et al.*, 2016).

A glutathione (GSH) consiste no tiol não proteico (NPSH) mais abundante e é um antioxidante não enzimático fundamental no controle da

formação de EROs (PISOSCHI; POP, 2015). Os níveis de tiois não proteicos podem aumentar em função de uma resposta adaptativa do organismo contra os efeitos danosos das EROs (CHAËBANE *et al.*, 2018). Apesar da ativação da GST indicar que ocorreu maior formação de EROS, não ocorreram alterações nos níveis NPSH nas larvas de *P. gracilis* expostas a cipermetrina e fipronil. Essa resposta não reflete uma defesa das larvas a exposição aos inseticidas, porém, corrobora com os resultados de outro estudo onde após a exposição de 21 dias ao herbicida atrazina e ao fungicida tebuconazole, larvas de *P. gracilis* não apresentaram alterações nos níveis de NPSH, apesar de ambos os agrotóxicos terem causado dano oxidativo (STURZA, 2017).

O acúmulo de EROS, como o H_2O_2 e o radical superóxido (O_2^-), danifica os componentes celulares, como DNA, proteínas e lipídios (LOPEZ *et al.*, 2006). Assim, um aumento nos níveis de proteína carbonil representa ruptura no metabolismo de proteínas celulares resultantes de dano oxidativo (KHAZRI *et al.*, 2016). O aumento de proteína carbonil em *P. gracilis*, nas três concentrações mais altas de cipermetrina e nas quatro de fipronil indica que ambos os agrotóxicos causaram oxidação de proteínas nas larvas expostas, apesar de ter ocorrido aumento na atividade de SOD e GST para cipermetrina e CAT e GST para fipronil. Resultados similares foram observados em outros organismos como no mexilhão de água doce exposto a cipermetrina (KHAZRI *et al.*, 2016) e em carpas expostas a condições de campos de arroz tratados com fipronil (CLASEN *et al.*, 2012).

Neste estudo não houve alteração nos níveis de TBARS para cipermetrina e observou-se redução no nível a partir de $50 \mu g.L^{-1}$ de fipronil. O aumento na atividade das enzimas SOD e GST após a exposição a cipermetrina pode ter contribuído para evitar o dano as membranas lipídicas. Já para fipronil, a ativação da CAT e GST pode ter promovido uma redução na peroxidação, contribuindo para a manutenção da integridade das células. Resultados semelhantes de redução dos níveis de TBARS também ocorreram em peixes expostos a outros agrotóxicos, como em *Rhamdia quelen* expostos ao herbicida clomazone (CRESTANI *et al.*, 2007) e, *Leporinus obtusidens* expostos aos herbicidas quinclorac, propanil e metsulfuron methyl (MORAES *et al.*, 2007).

Ambos os inseticidas têm potencial de causar neurotoxicidade e dano oxidativo. Para cipermetrina e fipronil a legislação a nível federal não estabelece os limites máximos permitidos na água de consumo humano e tampouco para os recursos hídricos (BRASIL, 2011). No estado do Rio Grande do Sul, a legislação estabelece o limite de 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na água de consumo humano para cipermetrina e 1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para fipronil (SECRETARIA DA SAÚDE, 2014). Neste estudo verificou-se que concentrações de cipermetrina inferiores ao permitido na legislação causam efeitos deletérios em larvas de *P. gracilis*, mostrando que o valor da legislação precisa ser revisto. Para fipronil, o limite máximo estabelecido pela legislação é inferior a concentrações encontradas em recursos hídricos no Brasil que estão entre 3,45 e 26,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (SILVA *et al.*, 2009; MARCHESAN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016), indicando não conformidade com a legislação e contaminação da água.

5 CONCLUSÃO

Nesse estudo *P. gracilis* foi sensível a concentrações ambientalmente relevantes de cipermetrina e fipronil que podem ser encontradas em seu habitat natural. Esses inseticidas mostraram que são tóxicos a nível bioquímico as larvas de *P. gracilis*, pois causaram alterações em todas as análises bioquímicas realizadas, com exceção de TBARS em cipermetrina e tióis para ambos. Essas alterações mostram potencial de efeito no sistema nervoso central e de dano oxidativo.

Concentrações subletais afetaram enzimas do sistema colinérgico (AChE e BChE), demonstrando que as larvas podem ter a sobrevivência comprometida na natureza em função, por exemplo, de dificuldade de locomoção, fuga de predadores e obtenção de alimento. Também, foram observados efeitos prejudiciais nas defesas antioxidantes que podem resultar em estresse oxidativo e dificuldade de eliminação do toxicante pelo organismo. Sendo assim, os efeitos verificados nos biomarcadores bioquímicos de *P. gracilis* indicam que é possível utilizá-los para fins de monitoramento da toxicidade de inseticidas em anfíbios e para evitar que efeitos irreversíveis ocorram na sua população e no ecossistema.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, p. 779-787, 2016.
- ANVISA. **C10 –Cipermetrina**, 2018. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C10%2B%2BCipermetrina.pdf/37400888-3f11-44ed-b53f-dea1abacb865>>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- ANVISA. **F43 – Fipronil**, 2017. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/f43.pdf/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9>>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- ARDESHIR, R. A.; ZOLGHARNEIN, H.; MOVAHEDINIA, A.; SALAMAT, N.; ZABIHI, E. CYP1A gene expression as a basic factor for fipronil toxicity in *Caspian kutum* fish. **Toxicology Reports**, v.5, p.113-124, 2018.
- ATTADEMO, A. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.; LAJMANOVICH, R.C.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C.; BASSÓ, 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, n. 1, p. 274-282, 2011.
- AYDIN-SINAN, H.; GÜNGÖRDÜ, A.; OZMEN, M. Toxic effects of deltamethrin and λ -cyhalothrin on *Xenopus laevis* tadpoles. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, n. 47, p. 397-402, 2012.
- BALDESSARINI, R. J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: psychosis and anxiety. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**, 6.ed. New York: Mcgraw-Hill, 1996. cap. 17, p. 399-430.
- BÁLINT, T.; SZEGLETES, Z. S.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous metidation and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 33, p. 279-295, 1995.
- BIGA, L. M.; BLAUSTEIN, A. R. Variations in lethal and sublethal effects of cypermethrin among aquatic stages and species of anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2855-2860, 2013.
- BELLUTA, I.; ALMEIDA, A. A.; COELHO, J. C.; NASCIMENTO, A. B.; SILVA, A. M.; Avaliação temporal e espacial no córrego do Cintra (Botucatu – SP) frente aos defensivos agrícolas e parâmetros físico-químicos de qualidade da água – um estudo de caso. **Energia na Agricultura**, v. 25, n. 2., p. 54-73, 2010.
- BOBÉ, A.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M.; MULLER, M. A. Behavior of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Journal of Pesticide Science**, v. 52, p.275-281, 1998.
- BOSCOLO, C. N. P.; FELÍCIO, A. A.; PEREIRA, T. S. B.; MARGARIDO, T. C. S.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. Comercial insecticide fipronil alters antioxidante enzymes response and accelerates the metamorphosis in

Physalaemus nattereri (Anura: Leiuperidae) tadpoles. **European Journal of Zoological Research**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2017.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2013.

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. Brasília, 2011.

BRADBURY, S. P.; CARLSON, R. W.; HENRY, T. R.; PADILLA, S.; COWDEN, J. **Toxic Responses of the Fish Nervous System.** In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E.; (Ed.). The Toxicology of fishes. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor, 2008. P. 417-456.

BRANDÃO, F. P.; MARQUES, S.; RODRIGUES, S.; SANTOS, B.; TRAVASSO, R.; VENÂNCIO, C.; PEREIRA, R.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M.; SOARES, A. M. V. M.; GONÇALVES, F. LOPES, I. Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi*. **Capitar**, v. 3, p. 66–77, 2011.

CALABRESE, E. J. Hormesis: Principles and applications. **Homeopathy**, v. 104, p.69-82, 2015.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, n.1, p. 73-81, 2011.

CARLOS, E. A.; NEVES, A. A.; REIS, C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determinação simultânea de triálometanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 272-278, 2011.

CHAÂBANE, M.; ELWEJ, A.; GHORBEL, I.; CHELLY, S.; MNIF, H.; BOUDAWARA, T.; ELLOUZE CHAABOUNI, S.; ZEGHAL, N.; SOUDANI, N. Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 645–652, 2018.

CHAGURI, J. L. **Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados.** 2016. 49f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.

CLASEN, B.; LEITEMPERGER, J.; MURUSSI, C.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; DALABONA, F.; MARCHEZAN, E.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. LORO, V. L. Carbofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 101, p. 77-82, 2014.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; CATTANEO, R.; MORAES, B.; LÓPES, T.; AVILA, L. A.; ZANELLA, R.; REIMCHE, G. B.; BALDISSEROTO, 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.

COX, B. C.; MARRITT, A. M.; PERRY, D. C.; KELLAR, K. J. Transporte de múltiplos receptores nicotínicos de acetilcolina no nervo óptico de ratos: altas densidades de

receptores contendo as subunidades $\alpha 6$ e $\beta 3$. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n.5, 1924-38, 2008.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, p. 2305 – 2311, 2007.

CUI, F.; CHAI, T.; QIAN, L.; WANG, S. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 169, p. 107-116, 2017.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; R. ROSSI, R.; MILZANI, A. 2003. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p.169-176, 2003.

DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticide Science**, v. 8, p. 651-660, 1977.

DEL SARTO, M. C. L.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona Quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, n. 5, p. 626-636, 2014.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4912–4916, 2000.

EELLS, J.T. Pyrethroid insecticide induced alterations in mammalian synaptic membrane potential. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 262, p.1173–81, 1992.

EPA. New Pesticide Fact Sheet — **Fipronil**. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances: Washington, DC, 1996.

ETCHEGOYEN, M. A.; RONCO, A. E.; ALMADA, P.; ABELANDO, M.; MARINO, D. J. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 63, p. 1-12, 2017.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

GHAZANFAR, M.; SHAHID, S.; QURESHI, I. Z. Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio*) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 43-52, 2018.

GRIPP, H. S.; FREITAS, J. S.; ALMEIDA, E. A.; BISNOTI, 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.

- GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005. p. 392.
- GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.
- HARTEL, T.; VON WEHRDEN, H. Farmed areas predict the distribution of amphibian ponds in a traditional rural landscape. **PLoS ONE**, v. 8, n.5, 2013.
- HERNÁNDEZ, J.A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R.C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p.1-15, 2016.
- HIPÓLITO, L., SÁNCHEZ, M.J. POLACHE, A.; GRANERO, L. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. **Current Drug Metabolism**, v. 1, p. 716–727, 2007.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório de comercialização de agrotóxicos: **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- IGNÁCIO, N. F. **Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda por fipronil**. 2018. 101 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018.
- JOHN, S.; KALE, M.; RATHORE, N.; BHATNAGAR, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 500–504, 2001.
- KAISAREVIC, S.; TENJI, D.; MIHAJLOVIC, V.; MICIC, B.; FRANCIJA, E.; PERIZ-STANACEV, J.; KRNIC SKILJO, B.; BRKIC, D.; TEODOROVIC, I. Comparative analyses of cellular physiological responses of non-target species to cypermethrin and its formulated product: contribution to mode of action research. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.65, p.31-39, 2019.
- KANEKO, H. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 2786-2791, 2011.
- KHAZRI, A.; SELLAMI, B.; DELLALI, M.; CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D.; BEYREMA, H.; MAHMOUDI, E. Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 129, p. 83-88, 2016.
- KORKMAZ, V.; GÜNGÖRDÜ, A.; OZMEN, M. Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin based pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 160, p. 265-272, 2018.

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

LAJMANOVICH, R.; PELTZER, P.; MARTINUZZI, C.; ATTADEMO, A.; BASSÓ, A.; MAGLIANESE, M.; COLUSSI, C. B-esterases and behavioral biomarkers in tadpoles exposed to pesticide pyrethroid-TRISADA®. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v.10, n. 5, p.237-244, 2018.

LAVILLA, E.; KWET, A.; SEGALLA, M. V.; LANGONE, J.; BALDO, D. ***Physalaemus gracilis***. The IUCN Red List of Threatened Species, 2010. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/details/57258/0>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

LOPEZ, E.; ARCE, C.; OSET-GASQUE, M. J.; CANADAS, S.; GONZALEZ, M. P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 940-951, 2006.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; MACAGNAN, L. P.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20699-20704, 2017.

MACHADO-VIEIRA, R.; BRESSAN, R. A.; FREY, B.; SOARES, J. C. Neurobiological basis of bipolar disorder. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 32, 2005.

MANN, R.M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C.B.; WILSON, S.P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p.2903-2927, 2009.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053-1059, 2010.

MARGARIDO, T. C. S.; FELÍCIO, A. A.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to fipronil (Regent® 800WG). **Toxicology Letters**, v. 205, p. 70, 2011.

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

MARINS, A. T.; RODRIGUES, C. C. R.; MENEZES, C. C.; GOMES, J. L. C. G.; COSTA, M. D.; NUNES, M. E. M.; VIEIRA, M. S.; DONATO, F. F.; ZANELLA, R. SILVA, L. P.; LORO, V. L. Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 151, p. 191-198, 2018.

MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MARIGOUDAR, S. R.; AHMED NAZEER, R.; DAVID, M. Cypermethrin induced: In vivo inhibition of the acetylcholinesterase activity in functionally different tissues of the freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Toxicological and Environment Chemistry**, v. 91, n.6, p. 1175-1182, 2009.

MEHTA, A.; VERMA, R. S.; SRIVASTAVA, N. Chlorpyrifos - induced alterations in rat brain acetylcholinesterase, lipid peroxidation and ATPases. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 42, p.54-58, 2005.

MENEZES, C.; LEITEMPERGER, J.; MURUSSI, C. VIERA, M. S.; MARTHA B. 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 Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1357–1368, 2016.

MILESON, B.E.; CHAMBERS, J. E.; CHEN, W. L.; DETTBARN, W.; EHRICH, M.; ELDEFRAWI, A. T.; GAYLOR, D. W.; HAMERNIK, K.; HODGSON, E.; KARCZMAR, A. G.; PADILLA, S.; POPE, C. N.; RICHARDSON, R. J.; SAUNDERS, D. R.; SHEETS, L. P.; SULTATOS, L. G.; WALLACE, K. B. Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. **Toxicological Sciences**, v. 41, p. 8–20, 1998.

MOHAMED, F.; SENARATHNA, L.; PERCY. A.; ABEYEWARDENE, M.; EAGLESHMAM, G.; CHENG, R.; AZHER, S.; HITTARAGE, A.; DISSANAYAKE, W.; SHERIFF, M. H. R.; DAVIES, W.; BUCKLEY, N., EDDLESTON, M. Acute human poisoning with the N- phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABAA – gated chloride channel blocker. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 42, n.7, p. 955-963, 2004.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (Cipermetrina e Deltametrina) em peixes – Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 58, 2012.

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, 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, n. 8, p. 1597-1601, 2007.

MORETTO, A. Organochlorine and pyrethroid insecticides. **Comprehensive Toxicology**, p.242-258, 2018.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. **Pharmacology and Toxicology**, v. 79, p. 1-14, 1996.

NAQVI, G.; SHOAIB, N.; ALI, A. M. Genotoxic potential of pesticides in the peripheral blood erythrocytes of fish (*Oreochromis mossambicus*). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 48, n. 6, p. 1643-1648, 2016.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, P.R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores**. Rio Claro, 2010. 173f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

OLIVEIRA, M. C. L. M; SANTOS, M. B; LOEBMANN, D; HARTMAN, A; TOZETTI, A. M. Diversity and associations between coastal habitats and Anurans in southern-most Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 85, p. 575–583, 2013.

PRUSTY, A. K.; MEENA, D. K.; MOHAPATRA, S.; PANIKKAR, P.; DAS, P.; S.K. GUPTA, S. K.; BEHERA, B. K. Synthetic pyrethroids (Type II) and freshwater fish culture: perils and mitigations. **Internacional Aquatic Research**, v. 7, p. 163-191, 2015.

PISOSCHI, A.M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 97, p.55-74, 2015.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2001. 178 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 2001.

RAO, G. V.; RAO, K. S. J. Modulation in acetylcholinesterase of rat brain by pyrethroid in-vivo and an in vitro kinetic study. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, p. 2259-2266, 1995.

REDDY, P. M.; PHILIP, G. H.; BASHAMOHIDEEN, M. D. Regulation of AChE system of freshwater fish, *Cyprinus carpio*, under fenvalerato toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, p. 18-22, 1992.

REDDY, S.K.; HUSAIN, K.; SCHLORFF, E.C.; SCOTT, R.B.; SOMANI, S.M. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. **Neurotoxicology**, v. 20, p. 977–987, 1999.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1143-1162, 2015.

ROBERTS, J. R.; REIGART, J. R. **Recognition and management of pesticides poisonings**. EPA: Washington, 2013.

RHÔNE-POULENC. **'Fipronil' Worldwide Technical Bulletin**. Lyon: RhônePoulenc Agrochimie, 1995, p.19.

SAMPSON, B.J.; BECKMAN, J.S. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu,Zn superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, p. 8-13, 2001.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa*

punctatus bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 295-301, 2003.

SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T. B.; JOHNSON, C. A.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, p. 1072–1077, 2006.

SECRETARIA DA SAÚDE. Portaria nº 320, de 24 de abril de 2014. **Estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS**. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 28 abr. 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: Mudanças Taxonômicas**, v. 5, n. 2, p.34-46, 2016.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p.1-16, 2001.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. D.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2383-2389, 2009.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamates and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, p. 215–228, 2002.

SOTOMAYOR, V.; CHIRIOTTO, T.S.; PECHEN, A.M.; VENTURINO, A. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 119, p.48-53, 2015.

STEHLER, S.; SCHULZ, R. Global Insecticide Surface Water Contamination Assessment: BECT's Contribution in the Last Five Decades. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 5, p.563-564, 2016.

STURZA, P. F. **Toxicidade aguda e crônica em girinos de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) expostos à atrazina e tebuconazole**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim. 2017.

ULLAH, S.; ZUBERI, A.; ALAGAWANY, M.; FARAG, M. R.; DADAR, M.; KARTHIK, K.; RUCHI, T.; DHAMA, K.; IQBAL, H. M. N. Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 863-871, 2018.

VANZETTO, G. V. **Efeitos letais e subletais de cipermetrina e deltametrina em larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2016. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016.

VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVA, Z.; DOBSIKOVA, R.; NOVOTNY, L.; DUDZIK, M. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 10, p. 469-476, 2006.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHPIER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 3, n. 2, p. 66-72, 2010.

WAGNER, N.; ZÜGHART, W.; MINGO, V.; LÖTTERS, S. Are deformation rates of anuran developmental stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 394-401, 2014.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **Introducción a los Insecticidas**. 2004. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/261283387/INTRODUCCION-A-LOS-INSECTICIDAS>>. Acesso em: 05 jan. 2018.

WHEELOCK, C. E.; MILLER, J. L.; MILLER, M. G.; SHAN, G.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. D. Development of toxicity identification evaluation (TIE) procedures for pyrethroid detection using esterase activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, p. 2699–2708, 2004.

WHEELOCK, C. E.; EDER, K. J.; WERNER, I.; HUANG, H.; JONES, P.D.; BRAMMELL, B. F.; ELSKUS, A. A.; HAMMOCK, B. D. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 172-192, 2005.

WIJESINGHE, M.R.; BANDARA, M.G.D.K.; RATNASOORIYA, W.D.; LAKRAJ, G.P. Chlorpyrifos induced toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) larvae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 690-696, 2011.

WIRTH, E. F.; PENNINGTON, P. L.; LAWTON, J. C.; DELORENZO, M. E.; BEARDEN, D.; SHADDRIX, B.; SIVERTSEN, S.; FULTON, M. H. The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. **Environmental Pollution**, v. 131, p. 365–371, 2004.

WRUBLESWSKI, J.; REICHERT JR, F. W.; GALON, L.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 369-368, 2018.

YANG, Y.; NIU, L.; LI, S. Purification and studies on characteristics of cholinesterases from *Daphnia magna*. **Biomedicine & Biotechnology**, v. 14, n. 4, p.325-335, 2013.

ZIMATKIN, S.M.; PRONKO, S.P.; VASILIOU, V.; GONZALEZ, F.J.; DEITRICH, R.A. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, p. 1500–1505, 2006.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A formulação comercial testada de clorpirifós mostrou-se altamente tóxica para *P. gracilis* em concentrações letais e também causou mortalidade elevada em concentrações subletais.
- Após a exposição das larvas de *P. gracilis* a concentrações subletais do inseticida clorpirifós ocorreram alterações na atividade natatória, na morfologia da boca e no intestino.
- *P. gracilis* apresentou mecanismos antioxidantes para reverter o efeito de clorpirifós expresso pela ativação na atividade das enzimas SOD, CAT e GST e, pelo aumento dos níveis de tiois não proteicos (NPSH).
- Houve dano oxidativo em larvas de *P. gracilis* expostas a concentrações de clorpirifós encontradas no ambiente natural e permitidas na água de consumo pela legislação brasileira e da Argentina, representado pelo aumento nos níveis de proteína carbonilada.
- Houve efeito neurotóxico em todas as concentrações testadas de clorpirifós, representado pelas alterações na mobilidade, apesar da inibição da AChE ter ocorrido somente nas duas concentrações mais elevadas.
- Para cipermetrina e fipronil houve ocorrência de dano oxidativo e neurotoxicidade representado pelas alterações na atividade das enzimas AChE e BChE e, pelos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos como CAT, SOD e carbonil.
- Concentrações abaixo do permitido na legislação do Rio Grande do Sul para cipermetrina causaram efeitos prejudiciais as larvas de *P. gracilis*, indicando que esse limite necessita ser revisto.