

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

**Influência dos herbicidas Sulfentrazone (Boral® 500 SC) e Glifosato (Roundup® Original)
na composição bioquímica e nas defesas antioxidantes de *Melanophryniscus admirabilis*
(Anura: Bufonidae)**

Patrícia Rodrigues da Silva

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (051) 3320-3500 - Fax: (051) 3339-1564
CEP 90619-900
Porto Alegre – RS – Brasil

2017

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

**Influência dos herbicidas Sulfentrazone (Boral® 500 SC) e Glifosato (Roundup® Original)
na composição bioquímica e nas defesas antioxidantes de *Melanophryniscus admirabilis*
(Anura: Bufonidae)**

Patrícia Rodrigues da Silva

Orientadora: Dr^a. Guendalina Turcato Oliveira

Coorientador: Dr. Márcio Borges-Martins

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2017

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Toxicologia e Ecotoxicologia	11
1.2 Pesticidas e ecotoxicidade sobre diferentes organismos	13
1.2.1 <i>Breve histórico dos pesticidas</i>	13
1.2.2 <i>Classificação dos pesticidas de acordo com sua toxicidade</i>	14
1.2.3 <i>Herbicidas: Sulfentrazone e Glifosato</i>	15
1.2.4 <i>Características toxicológicas dos pesticidas</i>	17
1.3 Alterações fisiológicas decorrentes da exposição a pesticidas.....	18
1.3.1 <i>Biomarcadores do metabolismo intermediário</i>	18
1.3.2 <i>Biomarcadores do balanço oxidativo</i>	19
1.3.3 <i>Mecanismos antioxidantes</i>	23
1.3.4 <i>Alterações fisiológicas em organismos não alvo a partir da exposição a pesticidas</i> 27	
1.4 Anfíbios	28
1.4.1 <i>Declínios populacionais de anfíbios</i>	29
1.4.2 <i>Girinos</i>	31
1.4.3 <i>Família Bufonidae</i>	33
1.4.4 <i>Gênero Melanophryniscus e a espécie Melanophryniscus admirabilis</i>	34
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. JUSTIFICATIVA	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Coleta dos espécimes de <i>Melanophryniscus admirabilis</i>	41
4.2 Aclimação e desenho experimental.....	41
4.3 Análises Bioquímicas.....	44
4.3.1 <i>Determinação dos parâmetros do metabolismo intermediário</i>	44
4.3.2 <i>Determinação dos parâmetros do balanço oxidativo</i>	45
4.4 Análises Estatísticas	47

5. RESULTADOS.....	48
5.1 Parâmetros abióticos	48
5.2 Parâmetros morfológicos.....	48
5.3 Parâmetros do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo.....	50
5.3.1 <i>Controles (C5 e C9)</i>	50
5.3.2 <i>Sulfentrazone (Boral® 500 SC)</i>	50
5.3.3 <i>Glifosato (Roundup® Original)</i>	55
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
8. REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fórmula estrutural do herbicida Sulfentrazone (Google Imagens).....16
- Figura 2:** Fórmula estrutural do herbicida Glifosato (Google Imagens).....17
- Figura 3:** Ação conjunta da defesa antioxidante enzimática, envolvendo as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione S-Transferase (GST), além das enzimas Glutathione Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) (Hermes-Lima, 2004).....27
- Figura 4:** Localização da região Perau de Janeiro, no interior do município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul, Brasil, e formações fitogeográficas da região (Abadie, 2015).....35
- Figura 5:** Padrão de coloração a) dorsal e b) ventral de indivíduo adulto de *Melanophryniscus admirabilis*; c) poça presente em lajedo rochoso às margens do Rio Forqueta, na região Perau de Janeiro; e d) girinos em poça do ambiente natural. (Fotos: Márcio Borges-Martins (a); Patrícia Rodrigues da Silva (b, c); Luis Fernando Marin da Fonte (d)).....37
- Figura 6:** Níveis de a) glicogênio, b) proteínas totais e c) ácido úrico em girinos de *Melanophryniscus admirabilis* submetidos a diferentes concentrações do herbicida Sulfentrazone (Boral® 500 SC) (S [130 µg/L] e S [980 µg/L]). Os resultados são representados como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).....53
- Figura 7:** Níveis de a) lipoperoxidação (LPO), representado pelos níveis de TBARS, e de atividades das enzimas b) Superóxido Dismutase (SOD), c) Catalase (CAT) e d) Glutathione S-Transferase (GST) em girinos de *Melanophryniscus admirabilis* submetidos a diferentes concentrações do herbicida Sulfentrazone (Boral® 500 SC) (S [130 µg/L] e S [980 µg/L]). Os resultados são representados como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).....55
- Figura 8:** Níveis de a) glicogênio, b) proteínas totais e c) ácido úrico em girinos de *Melanophryniscus admirabilis* submetidos a diferentes concentrações do herbicida Glifosato (Roundup® Original) (G [234 µg/L] e G [2340 µg/L]). Os resultados são representados como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).....58
- Figura 9:** Níveis de a) lipoperoxidação (LPO), representado pelos níveis de TBARS, e atividades das enzimas b) Superóxido Dismutase (SOD), c) Catalase (CAT) e d) Glutathione S-Transferase (GST) em girinos de *Melanophryniscus admirabilis* submetidos a diferentes concentrações do herbicida Glifosato (Roundup® Original) (G [234 µg/L] e G [2340 µg/L]). Os resultados são representados como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).....60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentrações dos herbicidas Sulfentrazone (Boral® 500 SC) e Glifosato (Roundup® Original) utilizadas nos procedimentos experimentais com girinos de *Melanophryniscus admirabilis*.....43
- Tabela 2:** Organização do número de animais e tempo de procedimento (aclimação e exposição às diferentes concentrações dos herbicidas, conforme Tabela 1) em cada grupo experimental.....43
- Tabela 3:** Parâmetros abióticos mensurados ao longo de todo o período experimental nas cubas dos diferentes grupos experimentais: Controle 5 dias (C₅), Controle 9 dias (C₉), Sulfentrazone (S [130 µg/L] e S [980 µg/L]) e Glifosato (G [234 µg/L] e G [2340 µg/L]). Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação ao C₉.....49
- Tabela 4:** Peso (g) e comprimento (mm) mensurados na chegada dos espécimes ao Laboratório (Inicial), após o período de cinco dias de aclimação (C₅) e ao final do período experimental, em animais sem exposição ao herbicida (C₉) e expostos às diferentes concentrações dos herbicidas Sulfentrazone (S [130 µg/L] e S [980 µg/L]) e Glifosato (G [234 µg/L] e G [2340 µg/L]). A_{5dias} e A_{9dias} representam o percentual de crescimento em relação ao comprimento corporal Inicial; n representa o número de animais em cada grupo. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferença significativa (p < 0,05) em relação ao Inicial.....49
- Tabela 5:** Resultados para os diferentes parâmetros analisados nos girinos dos grupos Controles 5 dias (C₅) e 9 dias (C₉). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes representam diferença significativa (p < 0,05) entre os Controles.....51
- Tabela 6:** Resumo da análise estatística para os parâmetros do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo de girinos de *Melanophryniscus admirabilis* expostos a diferentes concentrações do herbicida Sulfentrazone (Boral® 500 SC). Foi considerado nível de significância de 5% (p < 0,05) para todas as análises.....51
- Tabela 7:** Resumo da análise estatística para os parâmetros do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo de girinos de *Melanophryniscus admirabilis* expostos a diferentes concentrações do herbicida Glifosato (Roundup® Original). Foi considerado nível de significância de 5% (p < 0,05) para todas as análises.....56

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Cláudia e Josué, pelo seu apoio sempre onipresente em todas as minhas decisões, não somente profissionais, mas de vida. Com certeza sem o apoio e base que vocês me deram, eu não chegaria até aqui. Obrigada por tudo: por me dar um lar, apoio financeiro e emocional, puxões de orelha e, principalmente, por ouvirem meus inúmeros desabafos durante estes dois anos. Gostaria de agradecer também à Grazi, irmã que a vida me deu. Como já disse, eu não poderia escolher melhor. Sou grata pela tua paciência comigo e por sempre me ajudar quando preciso. Amo vocês, família!

Agradeço à minha segunda família: meu namorado Igor e à família Granitoff. Vocês sempre me apoiam em minhas decisões e aplaudem minhas vitórias. Obrigada por tudo, sou muito feliz de fazer parte desta família. Ao meu namorado, obrigada por tudo: pela paciência inabalável, pela compreensão, por todas as ajudas que me deu durante estes dois anos, e principalmente pelo apoio psicológico e emocional. Obrigada por ser mais do que namorado e amigo, mas por ser um companheiro de vida, de caminhadas e objetivos em comum.

À minha “terceira família”, meus amigos! Muito obrigada Kamila e Heron, sempre presentes em minha vida e sempre me apoiando e vibrando comigo a cada conquista; muito obrigada Carine e Carlo, por ser nosso casal fiel de amigos, sempre dispostos a uma jogatina ou qualquer outro programa de índio para ficarmos juntos, nem que seja não fazer nada; obrigada também ao casal Vans e Hax: vocês também fizeram parte destes dois anos, cada um do seu jeitinho. Muito obrigada à Letícia e Jéssica, presentes que a Biologia me trouxe; sempre damos nosso jeitinho de nos reunir e celebrar essa amizade e a vida (especialmente à vida da Melissinha, gerada pela mamãe Jéssica e papai Fabrício). Agradeço também aos presentes que ganhei na SMAM: Flavinha e Ka, vocês são almas que fiquei muito feliz de (re)encontrar na minha jornada! Aos parceiros de jogatina, especialmente ao Bruno “Algodão” Fernandes, que muito me ajudou a desopilar e a rir um pouco quando precisava. Enfim, muito obrigada a todos os amigos que sabem que têm um cantinho especial reservado no meu coração.

Como não poderia deixar de ser, agradeço imensamente à minha orientadora, a Profa. Dra. Guendalina Turcato Oliveira, ou simplesmente “Profa. Guenda”. Muuuuito obrigada por todas as oportunidades que sempre me destes. Por abrir as portas do mundo científico para mim, por acreditar no meu potencial, por nunca desistir de mim, enfim, por ser minha “mãe científica”! Obrigada por acreditar nos meus sonhos e fazer com que se tornem realidade (por maior que seja meu “medo” e “desconfiança” às vezes)! Tenho muito carinho e admiração por ti, e fico muito feliz em saber que nossa “jornada científica” ainda se estenderá (pelo menos) pelos próximos quatro anos de Doutorado que vêm pela frente. Muito obrigada por tudo, sempre!

Agradeço imensamente também ao meu coorientador, prof. Dr. Márcio Borges-Martins, do Laboratório de Herpetologia da UFRGS. Muito obrigada por acreditar nas minhas ideias e embarcar junto comigo e com a profa. Guenda nesse “mundo louco” da Fisiologia. Obrigada por permitir que eu trabalhe com a espécie que sonhava desde o

TCC, este sapinho muito admirável! Obrigada pela paciência, sempre, e pela oportunidade de conhecer um pouco melhor o mundo da Herpetologia. Estou muito feliz que nossa jornada científica também continuará agora no Doutorado. Muito obrigada por tudo!

Às meninas do Laboratório de Herpetologia da UFRGS, Michelle e Thayná, sempre dispostas a me ajudar com as dúvidas sobre o sapinho, além de me auxiliarem com material sobre o assunto. Muito obrigada, Thayná, com a ajuda no campo para conseguir encontrar todos os girinos que precisava, juntamente com a Juliane e o Mateus! Obrigada pela paciência, risadas e pizzas.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Fisiologia da Conservação que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal e auxiliaram na realização deste trabalho, especialmente ao Artur (amigo e colega científico de longa data, obrigada por tudo, sempre), Luíza e Natália (colegas queridas sempre deixando o ambiente de trabalho mais leve, descontraído e “cafeinado”). Agradeço também à Tiziane, colega e amiga que o Mestrado me deu. Muito obrigada pelos desabafos, conselhos e muitas risadas, que com certeza tornaram estes dois anos mais leves. Obrigada pela amizade sincera, além do coleguismo. Te admiro como profissional e, acima de tudo, como pessoa. Agradeço também às colegas Camila e Mariana, e também à técnica Betânia, que fizeram parte do início da minha jornada no Mestrado e que agora seguem caminhos diferentes, mas que sempre lembro com muito carinho.

Agradeço também ao prof. Dr. João Feliz, do departamento de Estatística da Faculdade de Matemática (PUCRS), pela assessoria estatística e pelas ideias discutidas nesta oportunidade.

Por fim, agradeço a todos os professores do corpo docente do PPG Zoologia da PUCRS que auxiliaram em minha formação durante estes dois anos de Mestrado, sendo nas disciplinas ou durante os Seminários de Acompanhamento, sempre com boas dicas para melhorar esta Dissertação. A toda a equipe do PPG Zoologia da PUCRS (especialmente à secretária Patricia Costa, pela ajuda sempre solícita e eficiente) e à PUCRS pela infraestrutura que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

O incremento no uso de pesticidas vem ocasionando a degradação de diferentes ecossistemas, sobretudo aquáticos. Apesar de possuírem aplicações específicas a determinados organismos, sabe-se que os agrotóxicos são capazes de ocasionar alterações metabólicas e funcionais em diversos organismos não alvo. Os anfíbios constituem a Classe de vertebrados mais ameaçada globalmente, sendo que os declínios populacionais observados no mundo todo são decorrentes da ação sinérgica de diversos fatores, incluindo a fragmentação e degradação de habitat, principalmente para fins agrícolas, a exposição a contaminantes derivados destas atividades, dentre outros. Neste contexto, *Melanophryniscus admirabilis* é uma espécie de sapo bufonídeo micro endêmica, descrita atualmente para apenas uma localidade no estado do Rio Grande do Sul (Brasil), e avaliada como Criticamente em Perigo de extinção, em nível regional, nacional e global. O alto grau de ameaça desta espécie deve-se a um conjunto de fatores, como a fragmentação e perda de qualidade do habitat, principalmente devido à conversão de áreas para agricultura e à larga utilização de agrotóxicos no entorno da área de ocorrência da espécie. Com isso, o objetivo do presente estudo foi analisar possíveis alterações em parâmetros metabólicos e do balanço oxidativo em homogeneizado total de girinos de *M. admirabilis* expostos a duas concentrações de formulação comercial contendo Sulfentrazone (Boral® 500 SC) e outras duas contendo Glifosato (Roundup® Original). Foram analisados os níveis totais de glicogênio, proteínas e ácido úrico; a possível ocorrência de lipoperoxidação (LPO) através dos níveis de TBARS; e o nível de atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST). Os resultados obtidos evidenciaram alterações significativas nos parâmetros mensurados, nos grupos expostos às diferentes concentrações dos herbicidas Sulfentrazone e Glifosato. A partir disto, sugere-se que a mobilização conjunta das enzimas e metabólitos analisados possivelmente foi capaz de conter o dano oxidativo nestes animais. Entretanto, cabe ressaltar que as alterações observadas podem vir a afetar estes animais ao longo do ciclo de vida, especialmente durante e após o período metamórfico. A aparente inibição enzimática observada nos grupos expostos aos herbicidas, além de indicar grande suscetibilidade dos girinos frente à exposição a estes agentes, pode refletir um prejuízo da capacidade destes animais em lidar com situações ambientais adversas e sinérgicas, como a fragmentação de habitat, radiação UV e exposição a outros poluentes. A ausência de mortalidade nos girinos de *M. admirabilis* sugere resistência às concentrações dos herbicidas testados; contudo, caberia a comparação da capacidade antioxidante desta espécie com outras espécies taxonomicamente próximas. Assim, este estudo demonstrou que a exposição de girinos de *M. admirabilis* a concentrações subletais dos herbicidas Sulfentrazone e Glifosato conduziu a uma ruptura da homeostase que pode afetar a sobrevivência da espécie em etapas futuras de seu ciclo de vida. Seriam relevantes estudos futuros visando à compreensão dos efeitos de outras concentrações e herbicidas, bem como a análise de outros metabólitos e componentes do sistema antioxidante desta espécie.

ABSTRACT

INFLUENCE OF HERBICIDES SULFENTRAZONE (BORAL® 500 SC) AND GLYPHOSATE (ROUNDUP® ORIGINAL) ON THE BIOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT DEFENSES OF *Melanophryniscus admirabilis* (ANURA: BUFONIDAE)

The increased use of pesticides has caused the degradation of a variety of ecosystems, especially aquatic environments. Despite specific targets, agrochemicals are able to cause metabolic and functional alterations including in non-target organisms. Amphibians constitute the most globally threatened Class of vertebrates, and the population declines observed around the world are due to a synergy of different factors, including habitat degradation and fragmentation, mostly to agricultural purposes, and the exposure to contaminants derived of these activities, among others. Within this context, *Melanophryniscus admirabilis* is a micro endemic bufonid toad species, with occurrence registered to only one area in Rio Grande do Sul state (Brazil). This species has a critically endangered (CR) status, at regional, national and global levels. The great danger of extinction is due to several factors, including habitat fragmentation (especially for agricultural purposes) and the decreased habitat quality, mainly because of extensive use of agrochemicals in areas near of the natural habitat of this species. In view of the foregoing, the objective of the present study was to analyze possible alterations in metabolic and oxidative parameters in total homogenate of *M. admirabilis* tadpoles exposed to two different concentrations of commercial formulation containing Sulfentrazone (Boral® 500 SC) and two concentrations containing Glyphosate (Roundup® Original). The total levels of glycogen, proteins and uric acid were analyzed; as well as the possible occurrence of lipid peroxidation (LPO), expressed by TBARS levels; and the enzymatic activity of Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione S-Transferase (GST). The results showed significant alterations in metabolic and oxidative parameters, in groups exposed to Sulfentrazone and Glyphosate herbicides. Analyzing these results, we hypothesize that the associated mobilization of enzymes and metabolic parameters presumably was capable of counter the oxidative lipid damage in these animals. Despite of that, the observed alterations may affect these animals during its life cycle, especially during and after metamorphic period. The apparent enzymatic inhibition observed in groups exposed to the herbicides, in addition to indicate the great susceptibility of tadpoles to these agents, reflects an impairment of the ability of these animals to cope with adverse and synergistic environmental situations, such as habitat fragmentation, UV radiation and exposure to other pollutants. The absence of mortality suggests resistance of *M. admirabilis* tadpoles to the tested concentrations of herbicides; nevertheless, the comparison of the antioxidant capacity of this species against taxonomically related species would be relevant. Therefore, the present study has demonstrated that the exposure of *M. admirabilis* tadpoles to sub lethal concentrations of Sulfentrazone and Glyphosate herbicides has affected the homeostasis, thus affecting the survival, of these animals in later life cycle stages. However, further studies would be necessary, including other concentrations and herbicides, as well as the analysis of further metabolites and components of the antioxidant system of this species.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Toxicologia e Ecotoxicologia

A Toxicologia é uma ciência que ocupa-se de averiguar os efeitos nocivos decorrentes das interações de diferentes substâncias químicas sobre organismos vivos (Moraes *et al.*, 1991), sendo tais substâncias capazes de causar dano definidas como “venenos”. De acordo com definição do médico suíço Paracelsus (1493-1541), “todas as substâncias são venenos, sem exceção. É a dose que as define como veneno”, ou seja, tudo pode ser considerado veneno se em doses suficientemente altas para ocasionar danos significativos aos organismos, sendo estes danos normalmente indicados a partir da mortalidade ocasionada após a exposição destes organismos a determinadas substâncias (*e.g.* DL₅₀ ou LC₅₀) (Paoliello & Capitani, 2000). Porém, além de efeitos diretos ou letais, existe uma ampla gama de efeitos subletais, incluindo efeitos bioquímicos, fisiológicos e até comportamentais, decorrentes da exposição de organismos a doses extremamente baixas de determinadas substâncias químicas (Azevedo & Chasin, 2003).

O termo Ecotoxicologia, cunhado por Truhaut em 1969, diz respeito a uma área da ciência que unifica ecologia e toxicologia, definida como “o estudo dos efeitos danosos de substâncias químicas sobre organismos vivos, especialmente em populações e comunidades dentro de um ecossistema definido, e inclui os caminhos de transferência desses agentes e sua interação com o ambiente” (Truhaut, 1977). Ou seja, a Ecotoxicologia se ocupa em determinar os efeitos em nível de população, comunidade e ecossistema como um todo. Esse conceito foi formulado na época em que o aumento constante da quantidade de poluição nos ecossistemas exigiu o estabelecimento de uma nova ciência com base nos estudos dos efeitos ecológicos dos poluentes (Boudou & Ribeyre, 1989), especialmente decorrentes da expansão da industrialização e da agricultura.

Porém, uma parte essencial desta determinação é a identificação dos efeitos danosos em nível de indivíduo, especialmente a partir de exposição a concentrações extremamente baixas destas substâncias, o que pode fornecer informações precoces sobre possíveis alterações populacionais e ecossistêmicas em longo prazo (Walker, 2014).

Em relação aos aspectos toxicológicos da Ecotoxicologia, têm-se a importância do estudo das propriedades físico-químicas de poluentes, que são determinantes para o

entendimento de características como movimento, distribuição e persistência destas substâncias nos ecossistemas. No meio ambiente, as substâncias podem ser degradadas por processos químicos, como hidrólise e fotoxidação, ou bioquímicos. A estabilidade e velocidade de degradação de uma substância está relacionada à sua estrutura e a fatores abióticos, como temperatura, nível de radiação solar, pH e concentração de matéria orgânica nos ecossistemas. Algumas moléculas particularmente resistentes à degradação química apresentam meia-vida longa na biota, no solo, nos sedimentos e na água, causando maior impacto ao ecossistema; outras, por sua vez, ao sofrer degradação, originam produtos com toxicidade maior que a da substância precursora (Rosato, 1997).

As propriedades bioquímicas e fisiológicas dos organismos são de extrema relevância no sentido de determinar os efeitos ocasionados pelos poluentes (*e.g.* toxicidade e mecanismo de ação). O metabolismo é essencial para a determinação de possíveis efeitos de poluentes sobre os organismos, principalmente em relação à ocorrência de biomagnificação, movimento e persistência nas cadeias tróficas (Walker, 2014).

Neste aspecto, é essencial o desenvolvimento de testes de ecotoxicidade que visem responder questões acerca dos efeitos tóxicos de determinada substância química em espécies de interesse. Por motivos que otimizam custo e benefício destes testes, são utilizadas algumas espécies modelo, além do *design* de biomarcadores específicos para a determinação dos possíveis efeitos danosos. Por meio desses testes são fornecidas informações sobre o perigo potencial dos efeitos de uma substância tóxica aos organismos, incluindo tanto efeitos diretos, como a letalidade, quanto efeitos indiretos ou subletais, como alterações no desenvolvimento, metabolismo, crescimento, reprodução, mutagênese, teratogênese, carcinogênese e desordens comportamentais (Baudo, 1987).

Os aspectos ecológicos da Ecotoxicologia envolvem o biomonitoramento dos efeitos de poluentes a níveis populacionais, de comunidade e ecossistemas, sendo os dois últimos normalmente consequência de efeitos a nível individual. Existem relações complexas entre diferentes populações na natureza, e o efeito de um químico em uma população de uma determinada espécie pode resultar em efeitos em populações de outras espécies que coexistem no mesmo ecossistema, principalmente a partir de relações tróficas. Dessa forma, efeitos letais ou subletais de poluentes sobre os indivíduos de uma espécie podem ocasionar o declínio populacional da mesma ou de outras espécies relacionadas, em um panorama mais amplo (Walker, 2014).

Cabe ressaltar que o termo “poluente” normalmente é usado como sinônimo de “contaminante”, apesar de possuírem significados distintos. Contaminante se refere a substâncias químicas que são geradas por atividade antrópica ou que ocorrem naturalmente no ambiente, se caracterizando pela ocorrência em níveis considerados anormais nos ecossistemas; porém, não necessariamente implicam em danos ambientais ou aos organismos. O termo poluente, no entanto, se reserva aos contaminantes que possuem clara evidência de capacidade de causar dano aos organismos ou ecossistema onde estão inseridos, em concentrações consideradas normais, sendo normalmente substâncias produzidas por atividade antrópica (Walker, 2014).

1.2 Pesticidas e ecotoxicidade sobre diferentes organismos

1.2.1 Breve histórico dos pesticidas

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno são denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas para o controle de organismos considerados danosos a determinada cultura agrícola (Peres & Moreira, 2003). Dependendo do organismo-alvo, possuem distintas denominações, tais como fungicidas, acaricidas, molucidas, nematocidas, herbicidas, dentre outros, destinados ao controle de fungos, ácaros, moluscos, nematoides e plantas consideradas daninhas, respectivamente (Peres & Moreira, 2003).

As mais antigas referências de uso de substâncias como pesticidas datam do século XIX, com os primeiros registros do uso de piretroides usados como inseticidas, e o lançamento de produtos como *Paris Green* (arsenito de cobre), introduzido como um inseticida em 1867, e Mistura de Bordeaux, um precipitado insolúvel preparado com solução de sulfato de cobre, utilizado como fungicida (Hassall, 1990).

Desde então, até a primeira metade do século XX, pouco avanço se fez em relação aos pesticidas. Fungicidas de mercúrio foram introduzidos na Alemanha, em 1913, e o produto natural “Pó de Derris” (também conhecido como rotenona) foi introduzido como um inseticida em 1914. Em 1930, o composto químico dinitro-orto-cresol (DNOC) começou a ser utilizado como herbicida e fungicida e, em 1934, se iniciou a comercialização do fungicida *thiram* (Walker, 2014).

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), ocorreu o ápice do surgimento de uma gama de novas substâncias utilizadas como pesticidas. O inseticida DDT, o primeiro dos inseticidas organoclorados, foi sintetizado por Paul Müller em 1939 e patentado em 1942. Tornou-se amplamente utilizado para o controle de organismos

causadores de diversas doenças, como as transmitidas pelos mosquitos *Anopheles* spp. (e.g. malária). Durante a guerra, os inseticidas organofosforados e os herbicidas hormonais (e.g. ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético (MCPA) e o 2,4-D) foram descobertos (Azevedo & Chasin, 2003).

Após 1945, houve uma revolução na indústria dos pesticidas, com lançamento de novos produtos no mercado, ao passo que foram descobertos problemas relacionados com seu uso, especialmente em relação a resíduos do DDT e outros inseticidas organoclorados altamente persistentes na biota, causando danos a diferentes organismos. Esse problema foi relatado no livro “Primavera Silenciosa”, de Rachel Carson (publicado em 1962), onde a autora relata que alguns resíduos persistentes de DDT (como o metabólito DDE), bem como o inseticida deldrin, passavam pelo processo de biomagnificação nas cadeias tróficas, ocasionando declínios populacionais em toda a cadeia, inclusive em níveis tróficos mais elevados (Walker, 2014).

A partir destas descobertas, houve um crescente movimento no sentido de fabricação de pesticidas progressivamente menos persistentes no ambiente e na biota. Inseticidas organoclorados foram substituídos por organofosforados e carbamatos. Fungicidas com compostos organometálicos também foram substituídos por alternativas menos persistentes. Em suma, houve um incentivo na utilização de químicos de maior eficácia e segurança tanto em relação ao ambiente natural quanto aos organismos vivos. Este progresso deveu-se, em grande parte, a aprimoramentos no *design* dos pesticidas, graças ao avanço em biologia molecular, bioquímica e toxicologia nas últimas décadas (Walker, 2014).

1.2.2 *Classificação dos pesticidas de acordo com sua toxicidade*

A partir de testes desenvolvidos em laboratório a fim de determinar a dosagem que ocasiona 50% de letalidade (DL_{50}) a modelos biológicos utilizados nestes testes, os pesticidas podem ser classificados nas seguintes classes toxicológicas, de acordo com o seu grau de toxicidade aos seres vivos: I, II, III ou IV, correspondendo a extremamente tóxicos, altamente tóxicos, medianamente tóxicos ou pouco tóxicos, respectivamente (Braibante & Zappe, 2012).

A partir de informações sobre as propriedades físico-químicas das substâncias presentes no produto aliadas a resultados de testes de mobilidade e persistência no solo, além de resultados de testes de toxicidade aguda e crônica desenvolvidos com diferentes organismos não alvo, os agrotóxicos podem ser classificados nas seguintes classes de

periculosidade ambiental: I, II, III ou IV, correspondendo a produtos altamente perigosos, muito perigosos, perigosos e pouco perigosos ao meio ambiente, respectivamente (Peres & Moreira, 2003).

1.2.3 Herbicidas: Sulfentrazone e Glifosato

Dentre os pesticidas, os herbicidas são as substâncias mais utilizadas em diferentes culturas agrícolas. Possuem aplicação específica para controle de plantas consideradas daninhas, sendo que primariamente seriam considerados pouco tóxicos a animais (Walker, 2014). Entretanto, diversos trabalhos vêm demonstrando os efeitos toxicológicos, carcinogênicos e até mutagênicos dos herbicidas sobre diversos organismos, especialmente organismos não alvo.

1.2.3.1 Sulfentrazone (Boral[®] 500 SC)

O herbicida Sulfentrazone, vendido sob nome comercial Boral[®] 500 SC, é fabricado pela FMC Corporation, de aplicação pré-emergente, seletivo condicional. Sua utilização é indicada em culturas de cana-de-açúcar, soja, café, eucalipto, citros, fumo, além de seu uso em pátios industriais (Niekamp & Johnson, 2001; Rodrigues & Almeida, 2005; MAPA, 2016).

Possui mecanismo de ação sistêmica no controle de várias espécies de plantas consideradas daninhas, mono e dicotiledôneas, incluindo espécies latifoliadas, gramíneas e ciperáceas em geral, especialmente a tiririca (*Cyperus rotundus* L.). Este herbicida age como destruidor de membranas celulares, pelo processo de oxidação da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX ou PPO), que leva ao acúmulo da protoporfirina IX, ocasionando a peroxidação do O₂ e, por consequência, a destruição das membranas celulares de plantas (Dan Hess, 1993).

Este herbicida pertence ao grupo químico das triazolinonas; seu nome químico, segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), é N-[2,4-dicloro-5-(4-difluorometil)-4,5-dihidro-3metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]fenil]metano-sulfonamida, que corresponde à fórmula molecular C₁₁H₁₀C₁₂F₂N₄O₃S (Rodrigues & Almeida, 2005), e cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1.

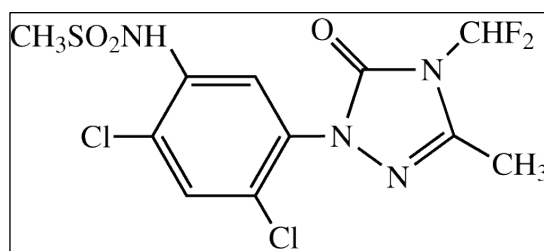


Figura 1: Fórmula estrutural do herbicida Sulfentrazone (Google Imagens).

O Sulfentrazone corresponde à classe toxicológica IV, sendo considerado pouco tóxico aos seres vivos, e à classe de periculosidade ambiental III, sendo um produto perigoso ao meio ambiente (MAPA, 2016).

É um herbicida altamente móvel e persistente no solo, possuindo um grande potencial de lixiviação para as águas subterrâneas e movimentação por escoamento superficial (Rodrigues & Almeida, 2005), e sua meia-vida no solo é estimada entre 110 e 280 dias, variando a partir das condições edafoclimáticas locais (FMC, 1995). Seus resíduos são altamente persistentes em ambientes subterrâneos, especialmente aquáticos, possuindo uma dissipação muito lenta. A concentração de Sulfentrazone permitida em água para consumo humano é de $0,98 \text{ mg.L}^{-1}$ (USEPA, 2003).

1.2.3.2 Glifosato (*Roundup*[®] Original)

O herbicida Glifosato, cujo principal nome comercial é *Roundup*[®] Original, é fabricado pela Companhia Monsanto, de aplicação pós-emergente, não seletivo, de ação sistêmica no controle de várias espécies de plantas consideradas daninhas. Sua utilização é indicada em diversas culturas, anuais e perenes, como soja, milho, café, citros, maçã, fumo, uva, cana-de-açúcar, pastagens, dentre outras (Galli & Montezuma, 2005). Por possuir amplo espectro de ação, é um dos herbicidas mais frequentemente aplicados em atividades agrícolas ao redor do mundo (Hultberg, 2007).

Seu modo de ação consiste na inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que ocasiona a interferência no controle de entrada de carbono na via do chiquimato das plantas, causando considerável dreno de carbono produzido na fotossíntese, acumulando chiquimato e reduzindo drasticamente a produção fotossintética de sacarose (Carvalho, 2013).

Este herbicida pertence ao grupo químico das glicinas substituídas; seu nome químico, segundo a IUPAC, é N-(fosfonometil) glicina, que corresponde à fórmula molecular $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ (ANVISA, 2016), e cuja fórmula estrutural está representada na Figura 2.

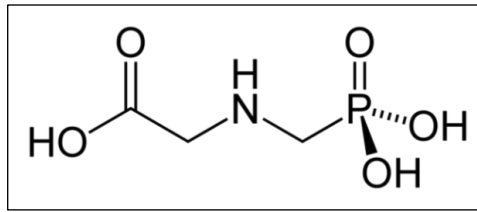


Figura 2: Fórmula estrutural do herbicida Glifosato (Google Imagens).

O Glifosato corresponde à classe toxicológica IV, sendo considerado pouco tóxico aos seres vivos e, à classe de periculosidade ambiental III, sendo um produto perigoso ao meio ambiente (ANVISA, 2016). É altamente solúvel em água e, devido às suas propriedades físico-químicas, é apenas ligeiramente móvel ou imóvel no solo, de acordo com o pH; possui persistência variável, baixo potencial de lixiviação e meia-vida estimada de 30 a 90 dias, dependendo do nível de matéria orgânica e do tipo de solo (Many & Barriuso, 2005; Rodrigues & Almeida, 2005).

As concentrações de Glifosato utilizadas na agricultura variam entre 0,36 e 2,16 mg.L⁻¹ (Rodrigues & Almeida, 2005), sendo que a concentração permitida em água potável é de 0,5 mg.L⁻¹ (BRASIL, 2011); já a Resolução do CONAMA nº 357/2005 estabelece como valor máximo permitido para águas de Classe II (que podem ser utilizadas para o consumo humano após tratamento) a concentração de 0,065 mg.L⁻¹ de Glifosato (CONAMA, 2005).

1.2.4 Características toxicológicas dos pesticidas

Mesmo com a fabricação de pesticidas com *designs* que permitem ações cada vez mais específicas a determinados tipos de organismos, alguns afetam indiscriminadamente outros indivíduos, de diferentes grupos taxonômicos, ocasionando, principalmente, efeitos subletais e de longo prazo.

Dentro deste contexto, é relevante salientar que determinadas substâncias têm efeitos adversos sobre organismos diferentes, de acordo com seu grau de toxicidade a cada um destes, que é definido pela dose necessária para produzir um efeito toxicológico nos organismos (Briggs, 1992), sendo que quanto maior a dose letal, menor a toxicidade da substância. Compostos químicos ocasionam efeitos diferenciados nos organismos, sendo mais tóxicos para alguns do que pra outros, ou seja, apresentam toxicidade seletiva entre as diferentes espécies, sexos ou até faixas etárias de um mesmo grupo de indivíduos, de acordo com sua suscetibilidade a determinado composto.

1.3 Alterações fisiológicas decorrentes da exposição a pesticidas

A exposição a pesticidas é um importante agente estressor a diversos organismos, principalmente aquáticos, acarretando letalidade e/ou mudanças metabólicas e bioquímicas nos tecidos de animais expostos a estes contaminantes (Nwani *et al.*, 2010). Além disso, pode ocorrer uma resposta fisiológica adaptativa, envolvendo mudanças no balanço metabólico e fisiológico, na tentativa de reestabelecer a homeostase destes organismos (Roy & Hänninen, 1993; Bonga, 1997; Sasikala *et al.*, 2011; Dornelles & Oliveira, 2014).

A análise de alterações em biomarcadores enzimáticos (*e.g.* atividade de enzimas antioxidantes) e em moléculas orgânicas (*e.g.* carbolinção de proteínas e lipoperoxidação), além de outros parâmetros metabólicos, constitui importante ferramenta para a avaliação do impacto de agentes estressores sobre diferentes organismos, bem como sobre a qualidade de habitat, servindo também como sinais precoces decorrentes de estresse ambiental (Cajaraville *et al.*, 2000; Cogo *et al.*, 2009; Jena *et al.*, 2009; Tsangaris *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2011). Estas ferramentas podem fornecer uma indicação do *status* fisiológico de organismos e populações, identificando tendências sazonais e espaciais, e permitindo uma avaliação de múltipla escala da qualidade ecossistêmica, muito útil para estudos ecofisiológicos e ecotoxicológicos (Peakall, 1992; Nunes *et al.*, 2015).

1.3.1 Biomarcadores do metabolismo intermediário

Algumas das respostas fisiológicas de animais expostos a agentes poluentes incluem uma variedade de mudanças em diversos parâmetros metabólicos, como a mobilização de substratos energéticos, expressa como depleções nas reservas de glicogênio, de triglicerídeos e de lipídios totais; inibição da síntese proteica e aumento do catabolismo proteico primordialmente no tecido muscular, com a diminuição nos níveis de proteínas totais; e mudanças nos níveis de ácidos graxos e colesterol (Oba *et al.*, 2009). Estes marcadores bioquímicos, além de sinalizar a presença de químicos exógenos com atividade biológica, podem fornecer um melhor discernimento sobre processos e mecanismos que podem estar prejudicados ou modificados pela ação de diferentes fatores, de origem antrópica ou natural (Nunes *et al.*, 2015).

Moléculas orgânicas como o fosfato de creatinina, o glicogênio, lipídios e triglicerídeos atuam como as principais fontes energéticas para os organismos em situações de alta demanda metabólica, sendo mobilizados para a liberação de energia de

acordo com a demanda. O glicogênio é um composto rapidamente metabolizável, sendo utilizado em situações que necessitam de uma fonte energética de rápida mobilização (Tiwari & Singh, 2003; Venkataramana *et al.*, 2006; Dua *et al.*, 2010; Dornelles & Oliveira, 2014; Nelson & Cox, 2014). Em situações de alta demanda metabólica, como frente à exposição a pesticidas, metabólitos como lipídios e triglicerídeos atuam como fontes primárias energéticas, apresentando ação direta no processo de detoxificação de compostos xenobióticos (Weissman, 1990).

Dentre os lipídios, o colesterol possui um papel constitutivo de membranas celulares, além de ser substrato para a síntese de hormônios esteroidais, podendo atuar também, segundo Engelking *et al.* (2005), como substrato energético. Conjuntamente com os fosfolipídios, as proteínas constituem a bicamada lipoproteica das membranas celulares, possuindo importante papel estrutural em diversos organismos e podendo ser utilizadas como fonte alternativa de energia para as células (Khan *et al.*, 2002; Susan *et al.*, 2010; Adamu & Kori-Siakpere, 2011). Entretanto, processos de catabolismo proteico podem levar à desestruturação e eventual morte celular e tecidual, considerando o papel estrutural destes metabólitos.

1.3.2 Biomarcadores do balanço oxidativo

1.3.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

1.3.2.1.1 Surgimento de O₂ atmosférico e do metabolismo aeróbico

O surgimento de oxigênio na atmosfera da Terra primitiva data de cerca de 2,45 bilhões de anos, quando esta molécula surgiu no chamado “Grande Evento de Oxidação” (Sessions *et al.*, 2009), decorrente principalmente da evolução da fotossíntese por cianobactérias. Um segundo aumento significativo no oxigênio atmosférico ocorreu há cerca de 600-800 milhões de anos, tendo sido acompanhado pela oxigenação dos oceanos e, posteriormente, pela emergência de seres multicelulares (Sessions *et al.*, 2009). O aumento na concentração de oxigênio na atmosfera (posteriormente formando a camada de ozônio O₃) e nos oceanos possibilitou uma grande diversificação das formas de vida (Falkowski, 2006).

A transição da atmosfera essencialmente redutora para uma oxidante foi caracterizado pela evolução de caminhos metabólicos de crescente complexidade. A adaptação à molécula de oxigênio (O₂) possivelmente surgiu de forma independente em espécies de diferentes linhagens, porém ainda não está esclarecido seu papel na configuração da diversidade taxonômica existente atualmente (Raymond & Segrè,

2006). Alguns seres evoluíram no sentido de utilizar O₂ no seu metabolismo, alavancando sua eficiência energética, sendo que o oxigênio certamente ampliou as capacidades metabólicas e bioquímicas destes organismos. Entretanto, tal evolução teve um custo: organismos aeróbicos precisaram desenvolver mecanismos para mitigar os efeitos tóxicos dos derivados metabólicos de oxigênio, tais como radicais livres e espécies reativas não radicais (Costantini, 2014).

1.3.2.1.2 Espécies radicais e EROs

A descoberta de radicais livres orgânicos deve-se ao cientista Gomberg (1900), da Universidade de Michigan. Gomberg identificou o radical trifenilmetil, sendo que, por tal descoberta, ficou reconhecido como o fundador da química dos radicais.

Radicais livres foram primariamente definidos como quaisquer espécies quimicamente instáveis (átomo, molécula ou íon) (Bernthsen, 1942; Herzberg, 1971). Mais recentemente, Halliwell & Gutteridge (2007) propuseram uma nova definição para radicais livres, os quais englobariam “quaisquer espécies capazes de existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados”, atributos que os tornam altamente instáveis e propensos a reagir com outras espécies químicas, e, dessa forma, possivelmente ocasionando danos oxidativos a macromoléculas e tecidos.

Entretanto, sabe-se que danos oxidativos não resultam, exclusivamente, da ação de radicais livres, mas também da ação de outras espécies químicas altamente reativas (*e.g.* peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e oxigênio *singlet*) que, apesar de não possuírem elétrons desemparelhados ou propriedades radicais, são prejudiciais a diversas moléculas orgânicas (Halliwell & Gutteridge, 1985; Meneghini, 1987; Castagne *et al.*, 1999; Matés, 2000; Jones, 2006). Tendo em vista tal variedade de agentes pró-oxidantes, o termo Espécies Reativas foi proposto para englobar espécies químicas de natureza tanto radical quanto não radical, bem como derivados de oxigênio (Espécies Reativas de Oxigênio – EROs) ou outros elementos, como nitrogênio (Espécies Reativas de Nitrogênio – ERNs).

As EROs são produzidas naturalmente como um subproduto do metabolismo do oxigênio molecular, durante o qual cerca de 2 a 5% das moléculas de oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviadas para outra via metabólica, e reduzidas de forma univalente (Koury & Donangelo, 2003; Schneider & Oliveira, 2004), dando origem a intermediários altamente reativos, tais como o radical ânion superóxido (O₂⁻), a hidroxila (OH[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Ferreira & Matsubara, 1997;

Cuzzocrea *et al.*, 2001). Por sua grande instabilidade, as EROs possuem um potencial oxidante, podendo reagir e causar danos a macromoléculas biológicas importantes, tais como membranas celulares. Cabe salientar, todavia, que espécies reativas não se caracterizam apenas como produtos tóxicos do metabolismo; são também moléculas essenciais em mecanismos de regulação e sinalização celular em diferentes organismos. Atuam como mensageiros redox em processos regulatórios (Thannickal *et al.*, 2000; Dröge, 2002), bem como desempenham importante papel na modulação do sistema imunológico, geração de ATP, dentre outras funções (Barbosa *et al.*, 2010).

As espécies reativas podem variar grandemente no seu potencial pró-oxidante e de dano biológico, o que é ecologicamente relevante, tendo em vista os tipos distintos gerados a partir de diferentes atividades dos animais (*e.g.* reprodução, forrageio). De qualquer forma, não se sabe o exato papel biológico das espécies reativas, o que poderia auxiliar no estabelecimento de sua verdadeira relevância ecológica, bem como sua relação com mecanismos de seleção natural (Costantini, 2014).

O oxigênio *singlet* não é uma espécie radical, visto que não possui elétrons desemparelhados (Halliwell & Gutteridge, 2007), correspondendo ao estado eletronicamente excitado do oxigênio. É produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídios de membrana, iniciando processos de peroxidação (Vasconcelos *et al.*, 2007).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O_2 . É rapidamente dismutado em solução aquosa, onde se caracteriza como forte agente redutor. Sua habilidade em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} pode acelerar a reação de Fenton (Vasconcelos *et al.*, 2007), que consiste na oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} pela ação do H_2O_2 , e então a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} novamente, resultando na formação de H_2O_2 , O_2 , e duas espécies radicais: hidroxila (OH^{\cdot}) e peroxila (HOO^{\cdot}) (Fenton, 1894; Haber & Weiss, 1934; Hammel *et al.*, 2002; Arantes *et al.*, 2011).

O radical hidroxila (OH^{\cdot}) pode ser gerado através da reação de íons metálicos com o H_2O_2 , ou por fissão homolítica da ligação O-O do H_2O_2 induzida por radiação UV (Halliwell & Gutteridge, 2007). É o mais reativo e lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, os organismos não dispõem de mecanismo de defesa. Este radical reage com uma série de compostos endobióticos, causando alterações no DNA

(e.g. modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica (Vasconcelos *et al.*, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa sem propriedades radicais, mas altamente tóxica para muitas células, responsável por ocasionar senescência e apoptose. Em níveis reduzidos, pode promover proliferação de certos tipos celulares, enquanto em níveis elevados, pode suprimir a apoptose e promover a morte celular por necrose (Halliwell & Gutteridge, 2007). É formado como produto intermediário da reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima SOD, sendo muito difusível dentro e entre as células. É um fraco agente oxidante e redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição, gera o radical hidroxila através da reação de Fenton (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Algumas das espécies reativas, como o ânion superóxido, são bem menos reativas que o radical hidroxila, e normalmente não reagem com moléculas biológicas em solução aquosa; entretanto, este radical reage com outros radicais, como NO^{\cdot} (radical derivado da molécula de nitrogênio) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.3.2.2 *Estresse oxidativo e Lipoperoxidação (LPO)*

Situações ambientais adversas, como ambientes poluídos por pesticidas, podem ocasionar a produção exacerbada de espécies reativas. Apesar de possuírem importantes papéis biológicos, se geradas em excesso ou em locais anormais do organismo, o balanço entre a formação e a remoção desses agentes pró-oxidantes por sistemas antioxidantes sofre um desequilíbrio, resultando em uma situação conhecida como estresse oxidativo, que pode ocasionar danos em moléculas orgânicas como DNA, proteínas, carboidratos, lipídios, dentre outras (Yoshikawa & Naito, 2002).

Os lipídios estão entre as moléculas orgânicas mais facilmente oxidáveis e, dessa forma, são substratos amplamente suscetíveis ao ataque das EROs via lipoperoxidação (Comporti, 1985). A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) está entre um dos melhores preditores do nível de dano sistêmico induzido por estes agentes (Saygili *et al.*, 2003), sendo um importante biomarcador de estresse oxidativo. Consiste em uma cascata de reações oxidativas resultantes da ação de EROs sobre os fosfolipídios das membranas celulares, que são bastante sensíveis à ação deletéria desses agentes pró-oxidantes (Lushchak & Bagnyukova, 2006). A intensidade da peroxidação lipídica pode

ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários ou ainda com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, o malondialdeído (MDA) que é ensaiado com o ácido tiobarbitúrico e expresso em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Lushchak & Bagnyukova, 2006).

A LPO é iniciada pelo ataque de uma espécie reativa (geralmente OH[•]) que abstrai um átomo de hidrogênio de um grupo metileno alélico, normalmente, de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação. Sob condições aeróbicas, o carbono radicalar do dieno conjugado reage com O₂ e forma o radical peroxila (RO₂[•]), que é capaz de abstrair H[•] de moléculas de lipídios adjacentes, cujo carbono radicalar sofre novo rearranjo, reage com O₂ e forma outro radical peroxila e assim sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. O radical peroxila combina-se com o H[•] abstraído, gerando o hidroperóxido lipídico (LOOH) que ao sofrer quebra, forma aldeídos como o malonaldeído e 4-hidroxinonenalaldeído, dentre outros. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcóxila através da reação de Fenton. A etapa de terminação, terceira e última etapa da peroxidação lipídica, inicia-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ou pela reação de dois radicais lipídicos, formando produtos não radicalares (Vasconcelos *et al.*, 2007). A formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) pode resultar em degradação fosfolipídica, injúria e desestruturação da membrana celular, resultando em danos teciduais e morte, em situações extremas (Comporti, 1985; Georgieva, 2005; Oruç & Usta, 2007).

Atualmente, o estudo da fisiologia do estresse oxidativo, bem como a regulação do *status* redox ganhou importante papel em áreas como medicina, bioquímica, fisiologia, farmacologia, ecotoxicologia e, mais recentemente, em ecologia evolutiva (Halliwell & Gutteridge, 2007; Costantini, 2008, 2014; McGraw *et al.*, 2010).

1.3.3 *Mecanismos antioxidantes*

A fim de lidar com a atividade pró-oxidante de espécies reativas, na tentativa de evitar situações de estresse oxidativo e a conseqüente ocorrência de lipoperoxidação em situações ambientais adversas, os organismos desenvolveram diversas estratégias, incluindo uma grande variedade de moléculas e caminhos metabólicos antioxidantes (Pamplona & Costantini, 2011). Os sistemas antioxidantes têm função de inibir ou

reduzir danos causados pela ação deletéria de agentes pró-oxidantes (Barbosa *et al.*, 2010).

Antioxidante pode ser definido como uma substância que atrasa, previne ou repara a ocorrência de dano oxidativo em uma molécula-alvo (Halliwell & Gutteridge, 2007). Pamplona & Costantini (2011) propuseram que antioxidante pode ser considerado quaisquer mecanismo, estrutura e/ou substância que previnem, atrasam, reparam ou protegem contra modificação química não enzimática a determinada molécula. Nesta definição, ficou estabelecido que determinadas estruturas dos organismos (*e.g.* membranas celulares) podem ser consideradas como mecanismos antioxidantes, visto que influenciam na resistência celular contra estresse oxidativo. Além disso, foi esclarecido que a modificação molecular considerada oxidativa deve ser de natureza não enzimática, a fim de distinguir de modificações oxidativas típicas de muitas reações redox que ocorrem normalmente no organismo (Costantini, 2014).

Os sistemas antioxidantes possuem componentes não enzimáticos e enzimáticos. Antioxidantes não enzimáticos atuam como cofatores de enzimas antioxidantes, sequestrando íons metálicos ou neutralizando espécies reativas através de sua oxidação passiva. As enzimas antioxidantes desempenham um importante papel na remoção de espécies reativas ou na sua transformação em compostos menos reativos, e também de derivados intermediários de dano oxidativo dos organismos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Antioxidantes não enzimáticos incluem moléculas de baixo peso molecular, como a glutatona, o ácido úrico, a melatonina, o ácido ascórbico, o tocoferol, dentre outros. Antioxidantes enzimáticos, por sua vez, englobam diferentes enzimas, dentre as quais, a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutaciona Peroxidase (GPx) são algumas das mais importantes e melhor estudadas enzimas antioxidantes, sendo responsáveis por neutralizar a ação das EROs sobre os sistemas biológicos. Além destas, destaca-se também a Glutaciona S-Transferase (GST), que faz parte de uma família de enzimas que atuam na fase II de metabolização de compostos endo e xenobióticos, possuindo papel na neutralização e eliminação de agentes pró-oxidantes, e, assim, auxiliando na manutenção da homeostase dos organismos (Gil-del Valle *et al.*, 1999; Moraes, 2008).

1.3.3.1 *Antioxidante não enzimático: Ácido Úrico*

O ácido úrico é o produto resultante do catabolismo de aminoácidos e purinas em diversos animais, sendo produto final da excreta nitrogenada de insetos, aves e répteis, e produto intermediário em anfíbios (Nelson & Cox, 2014). A biossíntese do ácido úrico é catalisada pela enzima xantina oxidase ou pela sua isoforma, a xantina desidrogenase (Choi *et al.*, 2005). Sendo caracterizado como uma excreta nitrogenada, sua excreção permite eliminar o nitrogênio excedente do organismo com a utilização de quantidades mínimas de água (Pillinger *et al.*, 2007). Em muitos peixes, anfíbios e mamíferos não primatas, o ácido úrico é degradado pela uricase ou urato oxidase, enzima que catalisa a conversão de urato em alantoína (Choi *et al.*, 2005) que, por ser uma substância mais solúvel que o urato, é mais facilmente eliminada (Terkeltaub *et al.*, 2006).

Em anfíbios, durante fases larvais, essencialmente aquáticas, o principal produto de excreção nitrogenada é a amônia, enquanto que, durante as fases adultas, primariamente terrestres, a ureia é a principal forma de excreta nitrogenada. A amônia é um composto extremamente tóxico, sendo que os animais não conseguem sobreviver nem mesmo a quantidades moderadas desta substância em seus fluidos corporais, além de ser necessária grande quantidade de água para sua eliminação. Por esta razão, durante a transição para o ambiente terrestre, através de seleção natural, foi favorecida a excreção de compostos nitrogenados menos tóxicos, como a ureia e o ácido úrico, sendo este último o subproduto nitrogenado com menor grau de toxicidade e, portanto, necessitando de quantidades ínfimas de água para sua eliminação. Constata-se, assim, durante a metamorfose, a alteração da excreção primariamente amoniotélica para ureotélica (Vitt & Caldwell, 2014).

O ácido úrico, além de produto intermediário de excreção de alguns anfíbios, pode atuar como molécula antioxidante não enzimática, sendo um importante *scavenger* de espécies radicais, tais como radicais hidroxila, oxigênio *singlet* e peroxinitritos (Ames *et al.*, 1981; Hooper *et al.*, 2000), podendo agir como um doador de elétrons na relação proteína/H₂O₂. Entretanto, o papel protetivo deste metabólito em situações de dano oxidativo é complexo, tendo em vista o caminho metabólico do ácido úrico ligado tanto à excreção nitrogenada quanto ao *turnover* de proteínas e a demandas antioxidantes (Monaghan & Costantini, 2014).

1.3.3.2 Antioxidantes enzimáticos: SOD, CAT e GST

A enzima Superóxido Dismutase (SOD) catalisa a reação de dismutação de duas moléculas do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e dois átomos de hidrogênio (H^+), resultando na formação de uma molécula do radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – um agente menos reativo em comparação ao radical superóxido, mas ainda um potencial causador de estresse oxidativo – e uma molécula de oxigênio (O_2) (McCord & Fridovich, 1969). A SOD é encontrada em diferentes compartimentos celulares, sendo que a forma citosólica é constituída de duas subunidades similares, cada uma contendo um equivalente de Cu^{2+} e um Zn^{2+} , enquanto a forma mitocondrial contém Mn^{2+} , similar à enzima encontrada em bactérias (Fridovich, 1998; Murray *et al.*, 2002).

A enzima Catalase (CAT) é uma hemoproteína que contém quatro grupos heme, possuindo atividade peroxidásica, ou seja, converte duas moléculas do radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio. Além disso, pode utilizar uma molécula de H_2O_2 como um substrato doador de elétrons, e outra molécula de H_2O_2 como oxidante ou acceptor de elétrons (Murray *et al.*, 2002). A atividade da CAT nos tecidos animais e vegetais ocorre, predominantemente, em organelas subcelulares, os peroxissomos (Ferreira, 2003), também sendo encontrada na matriz mitocondrial (Kowaltowski *et al.*, 2001). Os nutrientes mais importantes coadjuvantes da CAT são o ferro e os tocoferóis (vitamina E), que se encontram distribuídos na fase hidrofóbica da membrana celular (Gaetani *et al.*, 1989).

A Glutathione Peroxidase (GPx) atua conjuntamente com a CAT no processo de detoxificação do radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), estando localizada no citosol e na matriz mitocondrial (Llesuy, 2002). A GPx possui especificidade por glutathione como substrato para a catalisação da reação de redução de peróxido de hidrogênio, na qual a forma reduzida da glutathione (GSH) atua como agente redutor. A reação de redução do H_2O_2 resulta na formação de uma molécula de glutathione oxidada (GSSG) e uma molécula de água (Ferreira, 2002).

As Glutathione S-Transferases (GST) constituem uma família de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas, possuindo papel fundamental no processo de detoxificação e excreção celular de compostos potencialmente alquilantes (Chelvanayagam *et al.*, 2001). Diferentes compostos, incluindo xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como aqueles provenientes da peroxidação de lipídios, atuam como substratos para as GSTs (Van Der Aar *et al.*, 1996). As GSTs apresentam elevada especificidade pela glutathione

reduzida (GSH), um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, e que atua como cofator para as GSTs; a capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento sulfidrila (-SH), presente na cisteína. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalisada pelas GSTs, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a sua eliminação dos organismos (Habig *et al.*, 1974; Wattenberg, 1983; Lam *et al.*, 1994; Wheatley *et al.*, 1994).

A Figura 3 demonstra a ação conjunta das enzimas acima referidas (Hermes-Lima, 2004).

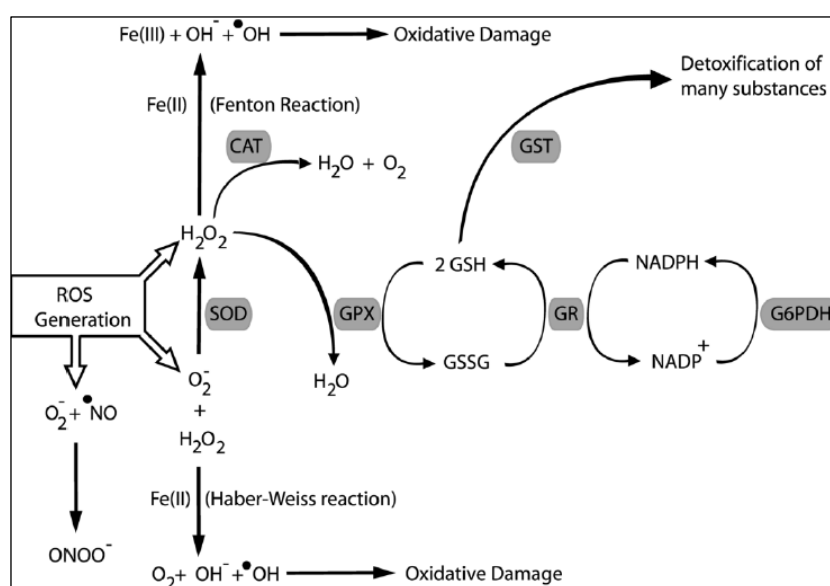


Figura 3: Ação conjunta da defesa antioxidante enzimática, envolvendo as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona S-Transferase (GST), além das enzimas Glutaciona Redutase (GR) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) (Hermes-Lima, 2004).

1.3.4 Alterações fisiológicas em organismos não alvo a partir da exposição a pesticidas

Os pesticidas, apesar de possuírem aplicações específicas, por propriedades como alta solubilidade em água e certa mobilidade, podem sofrer processos de lixiviação e escoamento por águas superficiais, resultando em sua detecção em ambientes localizados a grandes distâncias do local de aplicação, com subsequente acúmulo em diferentes habitats, sobretudo aquáticos (Pimentel, 1995).

A exposição a pesticidas é um importante agente estressor a diversos animais, principalmente aquáticos, ocasionando diversas mudanças metabólicas e bioquímicas nestes organismos (Nwani *et al.*, 2010), dentre os quais, os anfíbios estão entre os animais mais afetados (Davidson, 2004; Smalling *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2014).

1.4 Anfíbios

Os anfíbios (Classe Amphibia ou Lissamphibia) constituem um grupo de vertebrados tetrápodes não amniotas, divididos em três linhagens distintas: Gymnophiona ou Apoda (cecílias ou cobras-cegas), Urodela ou Caudata (salamandras e tritões) e Anura (sapos, rãs e pererecas), sendo esta última a ordem com maior diversidade dentro da classe Amphibia (Pough *et al.*, 2008). No mundo, atualmente, estão descritas 7.666 espécies de anfíbios (AmphibiaWeb, 2017), das quais cerca de 1.080 ocorrem no Brasil (Segalla *et al.*, 2016), sendo o país com maior diversidade de anfíbios do mundo.

Os indivíduos da ordem Gymnophiona não possuem membros anteriores ou posteriores, apresentando corpo cilíndrico e alongado, cabeça em forma de cunha e bastante ossificada, além de caudas obtusas, refletindo um estilo de vida fossorial. Os membros da ordem Caudata são anfíbios com corpos cilíndricos, caudas alongadas, cabeça e pescoço distintos e bem demarcados, além de membros usualmente bem desenvolvidos; a ordem é bastante diversa ecologicamente, visto que alguns são totalmente aquáticos, enquanto outros representantes do grupo são fossoriais, e alguns possuem hábito arborícola. A ordem Anura, por sua vez, engloba indivíduos com corpos robustos, sem cauda, com uma cabeça contínua com o corpo e membros anteriores e posteriores bem desenvolvidos, com aproximadamente o dobro do tamanho em relação ao corpo. Além de representarem a ordem mais diversa em distribuição e riqueza de espécies, os anuros são morfológica, fisiológica e ecologicamente bastante diversos (Vitt & Caldwell, 2014).

De forma geral, os anfíbios possuem tegumento altamente permeável, no qual ocorre a maioria das trocas gasosas e absorção de água e, também, onde se observa a presença de glândulas de muco, de ferormônios e de veneno (Pough *et al.*, 2008). É composto por uma epiderme externa e uma derme interna, onde se localizam as glândulas, nervos, músculos e células de pigmento (cromatóforos), com a abertura de seus respectivos dutos na superfície da epiderme. O tegumento dos anfíbios possui importante papel nas interações ambientais, como defesa (secreções, principalmente das glândulas de veneno), seleção sexual e comportamentos associados à corte (padrões de coloração e ferormônios), além de atuar na locomoção (Pough *et al.*, 2004).

A maioria dos anfíbios apresenta um ciclo de vida bifásico, ocupando essencialmente ambientes aquáticos durante a fase larval, e terrestres durante a fase adulta. Em virtude da fase aquática do ciclo de vida e, principalmente, pela alta

permeabilidade do tegumento (que facilita a perda de água por evaporação, podendo levar o animal a estresse hídrico), os anfíbios apresentam grande dependência da água, especialmente para fins reprodutivos, resultando na ocupação preferencial de ambientes úmidos – quando não aquáticos. Anfíbios que vivem em desertos ou locais com baixa umidade restringem sua atividade durante o dia – se tornando ativos somente à noite. Durante períodos de seca, algumas espécies utilizam estratégias para manter seu balanço hídrico, como permanecer enterradas no subsolo, realizando a absorção da água do solo através do tegumento (Pough *et al.*, 2004).

Os anfíbios se caracterizam como um grupo de grande importância ecológica, por uma diversidade de fatores. Participam de diversos elos das cadeias tróficas, visto que a energia ingerida por estes animais ectotérmicos é imediatamente convertida em biomassa, tornando-se disponível para transferência a níveis tróficos mais elevados (Pough, 1983; Stebbins & Cohen, 1995; Whiles *et al.*, 2006). Tanto em ecossistemas terrestres quanto dulcícolas, anfíbios adultos e suas fases larvais representam uma importante fonte de alimento para diversos predadores, incluindo invertebrados, peixes, outros anfíbios, répteis (particularmente serpentes), aves e mamíferos. Pelo processo de metamorfose, os anfíbios também representam um elo na transferência de nutrientes de ecossistemas aquáticos para terrestres (Gibbons *et al.*, 2006). Além disso, tendo em vista a grande permeabilidade e exposição do tegumento, estes animais podem ser bioindicadores altamente sensíveis a diferentes fatores ambientais (Blaustein, 1994).

Dessa forma, quaisquer alterações causadas a populações de anfíbios podem ocasionar desequilíbrio na estrutura e funções das diferentes comunidades onde estão inseridos, como padrões de produção primária, ciclagem de nutrientes, dinâmica de predadores, dentre outros, causando danos ao ecossistema como um todo (Whiles *et al.*, 2006; Vasconcelos, 2014).

1.4.1 Declínios populacionais de anfíbios

Os anfíbios constituem a Classe de vertebrados mais globalmente ameaçada (Wake & Vredenburg, 2008), com mais de 40% de espécies classificadas como ameaçadas de extinção, número superior a mamíferos ou aves, por exemplo – cerca de 26% e 13%, respectivamente (Frost, 2016; IUCN, 2016).

A preocupação acerca dos declínios populacionais de anfíbios teve seu início em 1989, quando um grupo de cientistas, durante o Primeiro Congresso Mundial de Herpetologia, em Canterbury, Inglaterra, começou a relatar suas preocupações sobre os

desaparecimentos de anfíbios em diferentes tipos de habitats. Estas comunicações informais resultaram em encontros formais, nos quais se pôde notar que herpetologistas do mundo todo tinham ciência de que anfíbios estavam desaparecendo de lugares onde anteriormente eram abundantes. A partir disto, em 1991 foi formada a Força Tarefa para o Estudo do Declínio de Populações de Anfíbios (DAPTF – sigla em inglês), a fim de investigar a situação e estabelecer uma rede de intercomunicações mundiais sobre o assunto, para responder à questão primária se os desaparecimentos de anfíbios eram um fenômeno global ou restrito a um pequeno número de localidades (Vitt & Caldwell, 2014).

Ao final dos anos 90, existia um grande número de notícias de declínios populacionais de anfíbios publicadas. Um *workshop* organizado em 1998 pela Fundação Nacional da Ciência (NSF, EUA), liderado por Andrew Storfer e Elizabeth Davidson, reuniu autoridades das mais diversas disciplinas – dentre elas, herpetologia, biologia populacional, toxicologia, doenças infecciosas, mudanças climáticas e políticas científicas. Ao final do evento, concluiu-se que existiam evidências suficientes de que havia ocorrido um declínio substancial e incomum na abundância e no número de populações de anfíbios em regiões geográficas globalmente distribuídas (Wake, 1998). Desde então, análises estatísticas, programas de monitoramento a longo prazo e investigações experimentais vieram no sentido de convencer a comunidade científica de que o declínio de anfíbios era, de fato, um fenômeno global (*e.g.* Alford & Richards, 1999; Pounds *et al.*, 1999; Lips *et al.*, 2003).

Diversos estudos apontaram que os declínios populacionais de diferentes espécies de anfíbios observados no mundo são resultantes da ação sinérgica de diferentes fatores, tais como aumento da radiação ultravioleta, a emergência de doenças infecciosas (como epidemias do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*), modificações e fragmentações de habitat, mudanças nas condições climáticas e exposição a contaminantes ambientais, como pesticidas (Wake, 1991; Alford & Richards, 1999; Stuart *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004; Beebee & Griffiths, 2005; Collins & Crump, 2009; Hayes *et al.*, 2010). Além disso, muitas vezes, os declínios populacionais observados são atribuídos a causas ditas enigmáticas, devido à grande quantidade de cofatores associados (Stuart *et al.*, 2004).

Os anfíbios são um grupo altamente sensível a contaminantes como os pesticidas, devido a duas principais razões (Quaranta *et al.*, 2009). Uma delas seria seu ciclo de vida complexo, envolvendo uma fase aquática e outra terrestre ou parcialmente

terrestre; assim, estes animais estão suscetíveis à exposição a contaminantes em ambos os ambientes (Verrell, 2000; Mann *et al.*, 2003; Dohm *et al.*, 2008). Adicionalmente, a alta permeabilidade do tegumento torna estes animais particularmente sensíveis a estressores físico-químicos, tais como radiação ultravioleta, patógenos ou xenobióticos (Quaranta *et al.*, 2009; Brühl *et al.*, 2011).

Porém, de forma geral, pesquisas toxicológicas realizadas com anfíbios ainda são escassas, em comparação a outros grupos de vertebrados, apesar de seu importante papel em diversos elos das cadeias tróficas de ambientes aquáticos e terrestres e sua grande suscetibilidade à ação de poluentes ambientais, principalmente durante a fase larval aquática (Stebbins & Cohen, 1995; Ezemonye & Tongo, 2009; Sparling *et al.*, 2010). A falta de pesquisas realizadas com anfíbios pode ser atribuída a três fatores principais: (1) ao pressuposto de que a sensibilidade de outras espécies aquáticas seja comparável à de anfíbios; assim, utilizando-se dados de peixes, por exemplo, supõe-se que seria possível a avaliação dos riscos impostos à estes animais, especialmente durante a fase larval aquática (girinos); (2) preocupações éticas e de bem estar animal sobre a utilização de vertebrados para testes toxicológicos; e (3) a ausência de diretrizes padrão para testes em anfíbios (Weltje *et al.*, 2013). Estas razões dificultam as pesquisas neste grupo taxonômico, resultando em uma lacuna no conhecimento toxicológico e de risco biológico que substâncias nocivas, principalmente de origem antrópica, representam a estes animais e ao ecossistema, como um todo.

1.4.2 *Girinos*

Os girinos correspondem à fase larval de anfíbios anuros, habitando, essencialmente, ambientes de água doce. Algumas espécies possuem desenvolvimento direto e, assim, não apresentam estágio larval aquático (Duellman & Trueb, 1994).

São bastante distintos morfologicamente em relação aos adultos, apresentando traços característicos de hábitos de vida aquáticos, tais como: tegumento frágil e delgado, constituído de duas ou três camadas epidérmicas; alta vascularização do tegumento, expressando seu papel como principal superfície respiratória, além das brânquias; troncos musculares e caudas adaptadas para movimentos ondulatórios para realizar o nado; esqueleto inteiramente ou majoritariamente cartilaginoso; e sistema de linha lateral bem desenvolvido (Vitt & Caldwell, 2014).

Possuem grande diversidade morfológica e de hábitos tróficos. Girinos nidícolas não se alimentam durante o estágio larval, consumindo o vitelo presente no ovo para

suprir as demandas energéticas. Outros, que se alimentam, possuem uma grande diversidade de modos e hábitos de alimentação, com adaptação das estruturas orais dedicadas a tal função. Os girinos não possuem dentes, contando com estruturas queratinosas ao redor do disco oral que auxiliam na raspagem de substratos duros ou na fragmentação de grandes partículas de alimento em pedaços menores (Vitt & Caldwell, 2014). Normalmente apresentam intestino bem maior e mais longo em comparação aos adultos, para melhor aproveitamento dos alimentos mais fragmentados que ingerem (Beebee, 1996).

Por possuírem respiração branquial, juntamente com a alta permeabilidade do tegumento em relação aos adultos, os girinos representam a fase de vida mais sensível do ciclo de vida de anfíbios anuros, sendo, portanto, mais vulneráveis a alterações em fatores bióticos e abióticos dos ambientes onde vivem (Vitt & Caldwell, 2014).

1.4.2.1 *Metamorfose*

A metamorfose corresponde ao período de transição do estágio larval para a fase juvenil e, posteriormente, adulta, na qual os indivíduos passam a ocupar preferencialmente ambientes terrestres ou parcialmente terrestres. Mais especificamente, pode ser definida como uma série de mudanças abruptas no período pós-embrionário, envolvendo transformações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Duellman & Trueb, 1994). Normalmente após seu início, transcorre em um curto período de tempo, evitando maior exposição e vulnerabilidade do girino em estágio metamórfico à ação de predadores, enquanto não ocupam definitivamente o ambiente terrestre, mas também não são mais exclusivamente aquáticos (Vitt & Caldwell, 2014).

A metamorfose pode ser dividida em três principais eventos: regressão de estruturas características da fase larval (como a cauda); transformação de estruturas larvais em uma forma mais adaptada para a vida adulta; e desenvolvimento de estruturas e funções que são essenciais para o adulto (Duellman & Trueb, 1994). Existem três estágios metamórficos definidos por Etkin (1932): pré-metamorfose, caracterizado por considerável crescimento e desenvolvimento de estruturas larvais, mas sem mudanças metamórficas; pró-metamorfose, um período de crescimento contínuo, especialmente dos membros, e início de mudanças metamórficas sutis; e clímax, o período de mudanças metamórficas radicais, culminando na perda da maior parte de caracteres larvais.

O processo metamórfico e seus estágios são essencialmente controlados por hormônios. A metamorfose se inicia e é mantida pelo hormônio tireoidiano tiroxina (T₄), que propicia grandes transformações a nível celular, bioquímico e morfológico nos girinos. Os demais eventos que ocorrem durante a metamorfose, incluindo alterações na expressão gênica, morfogênese, reestruturação tecidual e morte celular, resultam de resposta diferencial dos tecidos ao T₄ (Vitt & Caldwell, 2014).

Cabe salientar que algumas espécies de anfíbios, devido a fatores ambientais desfavoráveis, podem acelerar ou retardar o tempo necessário para a realização da metamorfose, o que pode implicar em consequências negativas futuras a nível individual ou populacional.

1.4.3 Família Bufonidae

A família Bufonidae agrupa os “sapos verdadeiros”, sendo composta por 604 espécies distribuídas em 52 gêneros (AmphibiaWeb, 2017), com representantes em todos os continentes, exceto Antártica e Austrália (Vitt & Caldwell, 2014). Os indivíduos desta família apresentam uma ampla gama de histórias de vida, sendo a maioria com hábitos terrestres ou semifossoriais, enquanto alguns são aquáticos e outros possuem hábitos arborícolas (Vitt & Caldwell, 2014).

A família inclui animais de pele seca, com glândulas paratóides supraoculares e glândulas menores distribuídas ao longo de todo o corpo (Wells, 2007). Os bufonídeos apresentam tamanho com variação desde menos de 20 mm até 230 mm, com membros anteriores e posteriores curtos, usados para caminhar ou saltar (Vitt & Caldwell, 2014).

A reprodução nesta família é diversificada, com espécies que colocam seus ovos na água e produzem larvas aquáticas, outras que apresentam desenvolvimento terrestre, e, nos gêneros *Nectophrynoides* e *Nimbaphrynoides*, ocorrência de viviparidade. Algumas características compartilhadas entre todos os animais da família são: ausência de dentes na maxila superior e inferior, presença de corpos adiposos inguinais, crânio altamente ossificado e presença de órgão de Bidder (AmphibiaWeb, 2017).

São os únicos anuros a apresentar o órgão de Bidder, que consiste em um ovário rudimentar presente em ambos os sexos (Duellman & Trueb, 1994). Se desenvolve na região anterior da gônada do indivíduo ainda em fase larval, enquanto a região posterior da gônada primordial transforma-se em testículo ou ovário, determinando o sexo do animal (Petrini & Zaccanti, 1998; Pough *et al.*, 2004). Segundo Orr (1986), o órgão de Bidder é uma massa de tecido ovariano vestigial que pode se tornar funcional em

determinadas circunstâncias. Durante o desenvolvimento da gônada, se houver estímulo específico, a região posterior do primórdio se transforma em testículo antes de completar a metamorfose, enquanto a anterior se manterá na condição feminina (Petrini & Zaccanti, 1998).

1.4.4 Gênero *Melanophryniscus* e a espécie *Melanophryniscus admirabilis*

1.4.4.1 Gênero *Melanophryniscus* Gallardo, 1961

O gênero *Melanophryniscus* Gallardo, 1961, é um gênero Neotropical que corresponde ao clado irmão de todos os demais remanescentes da família Bufonidae em diversas análises filogenéticas (e.g. Frost *et al.*, 2006; Pramuk *et al.*, 2008; Van Bocxlaer *et al.*, 2010). Atualmente, existem 30 espécies do gênero *Melanophryniscus*, sendo três descritas em 2015 (Frost *et al.*, 2006; Caramaschi & Cruz, 2011; Baldo *et al.*, 2012; Peloso *et al.*, 2012; Bornschein *et al.*, 2015; AmphibiaWeb, 2017), com distribuição restrita à América do Sul tropical e subtropical, incluindo a parte norte e central da Argentina, o sul do Brasil, o Paraguai, o Uruguai e a Bolívia. O Brasil é o país com maior diversidade do gênero, com 22 espécies descritas para o país até o momento (Segalla *et al.*, 2016).

O gênero possui pelo menos 10 espécies com algum grau de risco de extinção, de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (Zank *et al.*, 2014; IUCN, 2016), principalmente devido à ocorrência em áreas restritas e sob diferentes formas de impacto ambiental. Cabe ressaltar que as espécies deste gênero são de grande interesse para a conservação e para a farmacologia, visto que suas glândulas armazenam alcaloides provenientes de uma dieta rica em artrópodes (Daly *et al.*, 2007). Entretanto, para a maioria destas espécies, inexistem estudos de história natural, de distribuição geográfica e de ecologia populacional, o que dificulta uma correta avaliação do seu *status* de conservação (Abadie, 2015).

Os sapos do gênero *Melanophryniscus* apresentam coloração aposemática, que informa a presença de algum tipo de toxina ou substância impalatável a possíveis predadores que se guiam por sinais visuais, sinalizando que existirá um substancial custo caso prossigam com o ataque ou consumo da presa que apresenta estas substâncias (Mappes *et al.*, 2005). Os indivíduos deste gênero exibem a coloração aposemática através de uma postura de defesa, denominada reflexo “*unken*”, na qual os indivíduos arqueiam as plantas das patas traseiras e dianteiras afim de deixar expostas a

coloração normalmente vermelha destes membros, sinalizando sua impalatabilidade (e.g. Fernández, 1921; Langone, 1994; Baldo & Basso, 2004; Santos & Grant, 2011).

1.4.4.2 *Melanophryniscus admirabilis* Di-Bernardo, Maneyro & Grillo, 2006

A espécie *Melanophryniscus admirabilis* Di-Bernardo, Maneyro & Grillo, 2006, conhecida pelo nome popular sapinho-admirável-de-barriga-vermelha (Di-Bernardo *et al.*, 2006), é considerada micro endêmica, ocorrendo somente na região conhecida como Perau de Janeiro, a cerca de 19 km da região central do município de Arvorezinha (Rio Grande do Sul, Brasil). O município se localiza no Alto Vale do Taquari, mais precisamente na Encosta do Planalto, no nordeste do Rio Grande do Sul. Pertence ao bioma Mata Atlântica, com predomínio de vegetação florestal, onde se observa a presença de pinheirais, erva-mate e árvores nativas de várias espécies (Figura 4). Os dois principais rios do município são os rios Forqueta e Guaporé (FEPAM, 2016). Dentre as principais atividades agropecuárias da região estão o cultivo de erva-mate, de milho, a fumicultura, a avicultura, a suinocultura, a cultura de soja, e o florestamento de *Eucaliptus* sp. e de acácia, os quais são muito utilizados na secagem do fumo, da erva-mate e em aviários (EMATER, 2000, 2001).

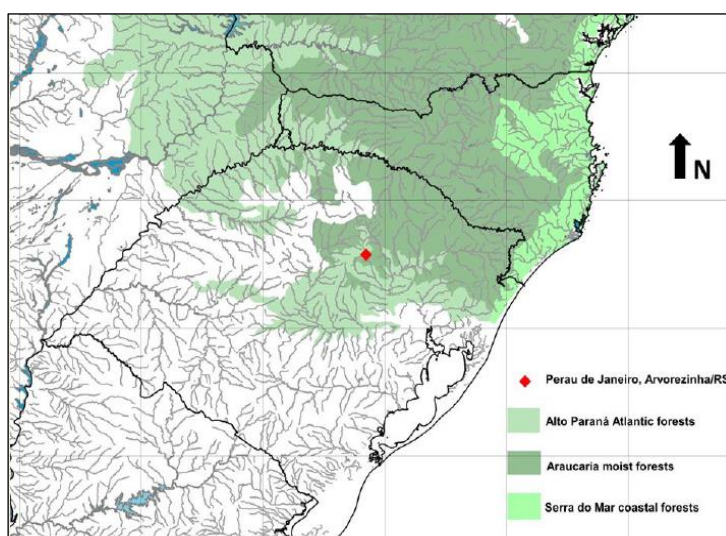


Figura 4: Localização da região Perau de Janeiro, no interior do município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul, Brasil, e formações fitogeográficas da região (Abadie, 2015).

Os indivíduos de *M. admirabilis* são encontrados na região Perau de Janeiro, em um vale estreito limitado por encostas íngremes, em uma área de cerca de 700 m às margens do Rio Forqueta (Di-Bernardo *et al.*, 2006). Na região, existem vales estreitos e profundos, associados a áreas com declive acentuado, sendo sua principal característica um paredão rochoso de mais de 200 m de altura e a presença de quedas d'água que se encontram com o rio Forqueta, que corta a região, resultando em forte

apelo turístico. O Perau de Janeiro se localiza em uma transição entre a Floresta Ombrófila Mista, com a ocorrência de elementos típicos como o pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*), e a Floresta Estacional Decidual, que apresenta queda foliar significativa durante a estação mais fria do ano (Leite & Klein, 1990). O clima predominante é o Subtropical Úmido, variedade Cfa (Köppen, 1931), que caracteriza-se por temperaturas médias entre -3°C e 18°C no mês mais frio e superiores a 22°C no mês mais quente, com precipitações bem distribuídas ao longo do ano, com total anual em torno de 1400 mm (FEPAM, 2016).

Os indivíduos adultos de *M. admirabilis* possuem tamanho entre 2,5 a 4 cm, e se caracterizam por apresentar coloração aposemática. No dorso, predomina a coloração verde (Figura 5a) e, ventralmente, a região inguinal e a planta das patas se caracterizam pela coloração vermelha, com o fundo do ventre possuindo coloração preta (Figura 5b). Tanto dorsal quanto ventralmente, destacam-se glândulas arredondadas bem desenvolvidas, em sua maioria com coloração verde-amarelada; as glândulas da região axilar apresentam coloração avermelhada (Figura 5b) (Di-Bernardo *et al.*, 2006).

Até recentemente, considerava-se que todas as espécies do gênero apresentavam reprodução do tipo explosiva, associada a corpos d'água temporários formados após chuvas intensas. Entretanto, estudos atuais sugerem que a biologia reprodutiva do gênero é muito mais complexa e diversificada entre as espécies, apresentando grandes variações entre estas (*e.g.* Steinbach-Padilha, 2008; Peloso *et al.*, 2012). Os indivíduos de *M. admirabilis* utilizam como sítio reprodutivo pequenas poças temporárias formadas no lajedo das margens rochosas do rio Forqueta (Figura 5c), sendo que a disponibilidade destas poças varia periodicamente, dependendo do nível do rio e da ocorrência de chuvas (Abadie, 2015). As desovas, geralmente constituídas por cerca de 15 ovos, são depositadas nestas poças, onde os ovos eclodem em girinos e, posteriormente, se metamorfoseiam em juvenis, completando o processo de metamorfose em cerca de 15 dias (Abadie, M. e Rodrigues, P. S. *pers. comm.* 2012; 2015). Os girinos atingem tamanho de até 15 mm de comprimento total, dependendo do estágio de desenvolvimento, e apresentam coloração críptica (Figura 5d).

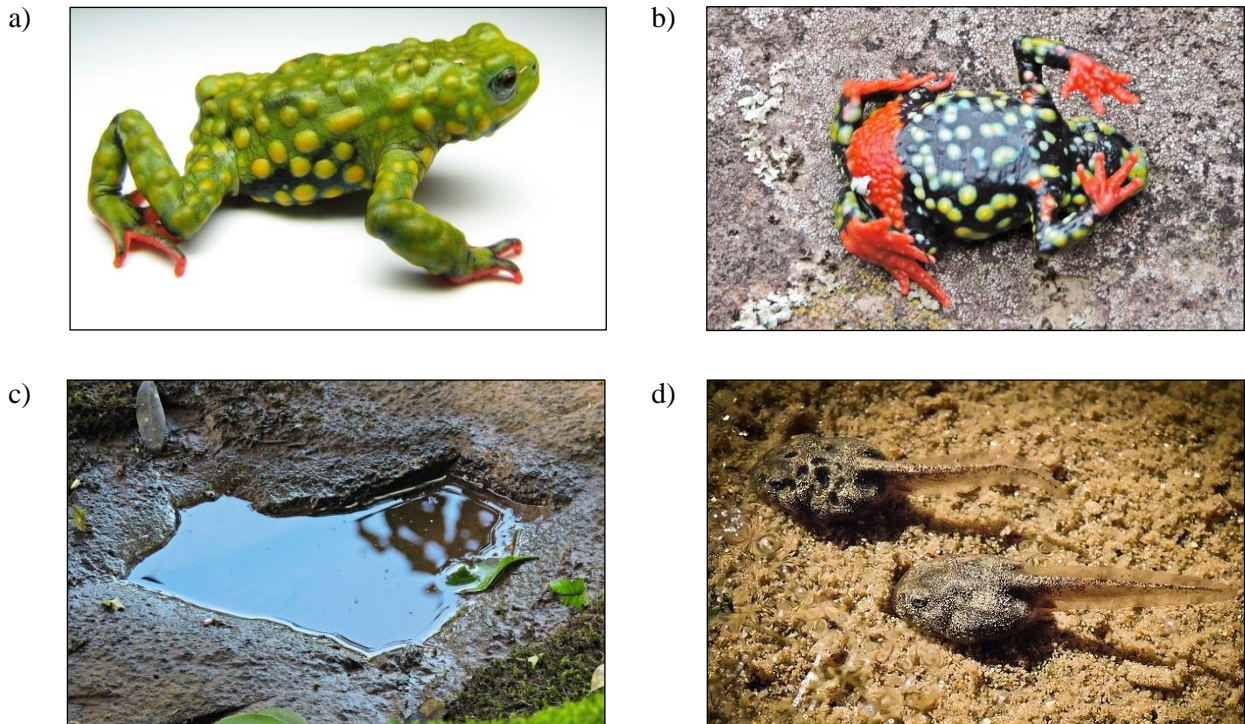


Figura 5: Padrão de coloração a) dorsal e b) ventral de indivíduo adulto de *Melanophryniscus admirabilis*; c) poça presente em lajedo rochoso às margens do Rio Forqueta, na região Perau de Janeiro; e d) girinos em poça do ambiente natural. (Fotos: Márcio Borges-Martins (a); Patrícia Rodrigues da Silva (b, c); Luis Fernando Marin da Fonte (d)).

M. admirabilis possui *status* de Criticamente em Perigo (categoria CR da IUCN), em nível global (IUCN, 2016), nacional (ICMBio, 2016) e estadual (FZB, 2014). O alto grau de ameaça se deve, principalmente, à restrita área de ocorrência da espécie, limitada a apenas uma localidade (*one threat-defined location*); à contínua substituição de ambientes naturais para outros usos, especialmente para fins agrícolas; além de biopirataria, pisoteio por turistas no sítio reprodutivo e à possibilidade de instalação de uma Pequena Central Hidrelétrica em uma área a poucos metros da região de ocorrência da espécie. Esta última ameaça, entretanto, encontra-se atualmente suspensa pela FEPAM, graças ao esforço conjunto da equipe do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, pertencente ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (RAN/ICMBio) e da ONG Instituto Curicaca (Fonte *et al.*, 2014).

Adicionalmente, outros fatores que ameaçam a espécie incluem a crescente perda de extensão e qualidade de habitat, principalmente devido à grande utilização de agrotóxicos nas atividades agrícolas próximas à área de ocorrência da espécie. O Perau de Janeiro está localizado em um dos maiores fragmentos remanescentes de Mata Atlântica da região, mas que vem sofrendo crescente degradação, devido a atividades

pecuárias (principalmente a criação de gado), e a plantações de tabaco (fumicultura) e *Eucaliptus* sp. em regiões próximas à área de ocorrência de *M. admirabilis*.

Assim, a larga utilização de agrotóxicos nas lavouras próximas é uma potencial e importante ameaça à *M. admirabilis* (Abadie *et al.*, 2011; Zank *et al.*, 2012), tendo em vista que a espécie vive em íntima relação de proximidade com o rio Forqueta. Os pesticidas, provavelmente drenados pela água do rio, podem afetar principalmente indivíduos em fase larval (girinos), que se desenvolvem nas poças temporárias presentes nos lajedos rochosos às margens do rio.