

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**EFEITO DOS HERBICIDAS BORAL® 500 SC E GLIFOSATO® ISOLADOS E
EM MISTURA SOBRE O BALANÇO OXIDATIVO, OS NÍVEIS DE GLICOSE E DE
CORTICOSTERONA DE *Rana catesbeiana* Shaw, 1802**

Anike Liedtke Lauffer Wilkens

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

**EFEITO DOS HERBICIDAS BORAL[®] 500 SC E GLIFOSATO[®] ISOLADOS E EM
MISTURA SOBRE O BALANÇO OXIDATIVO, OS NÍVEIS DE GLICOSE E DE
CORTICOSTERONA DE *Rana catesbeiana* Shaw, 1802**

Anike Liedtke Lauffer Wilkens

Orientadora: Dra. Guendalina Turcato Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE - RS – BRASIL

2017

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
APRESENTAÇÃO GERAL	10
1. Introdução	10
2. Desenho Experimental	19
Referências Bibliográficas	25
Capítulo 1	32
Resumo	34
1. Introdução	36
2. Material e Métodos	39
<i>2.1. Manutenção dos animais</i>	<i>39</i>
<i>2.2. Coleta para determinações bioquímicas</i>	<i>40</i>
<i>2.3 Determinação dos Fatores de Condição Nutricional</i>	<i>41</i>
<i>2.4 Marcadores Metabólicos</i>	<i>41</i>
<i>2.5. Marcadores do Balanço Oxidativo</i>	<i>42</i>
<i>2.6. Análise Estatística</i>	<i>45</i>
3. Resultados e Discussão	45
<i>3.1. Fatores de Condição Nutricional</i>	<i>45</i>
<i>3.2. Marcadores Metabólicos</i>	<i>47</i>
<i>3.3. Marcadores do Balanço oxidativo</i>	<i>50</i>
4. Conclusões	52
5. Agradecimentos	53
6. Referências	54
Tabela 1	60
Tabela 2	61
Figura 1	62
Figura 2	63
Figura 3	64
Figura 4	65
Figura 5	66
Figura. 6	67

Capítulo 2	68
Conclusões Gerais	69
Anexo I	70

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu forças e coragem e colocou cada um que aqui faço menção em meu caminho. Ao meu amado marido Rodrigo por sempre me motivar a correr atrás de meus objetivos e sonhos e pelo amor expresso de tantas maneiras. Aos meus pais Karla e Gilberto por sempre acreditarem em mim, pelas lições dadas. Aos meus sogros Marília e Nestor por todas as palavras amigas e apoio em horas que muito precisei. Aos meus avós e familiares queridos pelas palavras de força. Às colegas biólogas e amigas Aline, Gabriela, Giselle, Rosana e Betânia que sempre mantiveram o laço da amizade e deram apoio para eu me tornar Mestre em Zoologia. À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Guendalina Turcato Oliveira por ter aceitado o desafio de me orientar. Agradeço a paciência e a confiança em mim depositada desde o início. Agradeço os ensinamentos da teoria e da prática da vida profissional como minha mãe científica desde a minha graduação. Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia da Conservação Artur, Luiza, Camila, Patrícia, Tiziane, Esteban, Bruna, Natália e Rodrigo pela convivência, apoio técnico e a colaboração. Agradeço os queridos colegas da Zoologia Lourdes, Giuseppe, Fernando, Moisés, Pedro, Andres, Natália e Miguel pelas risadas nos momentos tanto fáceis quanto difíceis, ensinamentos de técnicas de coleta e experiências pessoais e profissionais. Agradeço os professores da Zoologia Santiago, Nelson e Sandro pelo grande apoio e ensinamentos. Agradeço a professora Aline da Faculdade de Letras pelos conselhos e palavras amigas e incentivo profissional e pessoal desde a minha formação como bióloga.

RESUMO

Dentre os químicos agrícolas, destacamos triazinas, aminoácidos fosfonados, benzenaminas, organofosforados, fenilpirazóis e aril triazolinonas por seu uso excessivo é um dos fatores que afetam o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de anfíbios. Dentre os agroquímicos mais utilizados mundialmente (inclusive Brasil) estão os herbicidas. Seu amplo uso é um dos fatores que afetam o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos anfíbios. Contudo, seus efeitos tóxicos em animais não foram ainda suficientemente estudados. Dessa forma, neste trabalho objetivamos estudar o efeito isolado e em mistura dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] sobre uma série de parâmetros bioquímico-funcionais (níveis de glicose; ácido úrico e corticosterona) no plasma, o balanço oxidativo no fígado e no músculo e sobre parâmetros de condição nutricional em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). Para tanto, utilizamos oitenta girinos em estágio de pró-metamorfose (ausência de membros aparentes) e adquiridos em ranário. Estes foram pesados, medidos e distribuídos em aquários sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12h luz:12h escuro), aeração constante, alimentados uma vez ao dia com ração comercial durante sete dias (grupo controle 7 - C₇). Após esse período, parte dos animais continuou nessas condições (controle 14- C₁₄) e, o restante dividido em três grupos sendo expostos a Boral[®] 500 SC (sulfentrazone: 130 $\mu\text{g/L}$), Glifosato[®] (glifosato: 234 $\mu\text{g/L}$) e uma mistura de Boral[®] mais Glifosato[®] (130 $\mu\text{g/L}$ mais 234 $\mu\text{g/L}$, respectivamente) durante mais sete dias. Depois do período de aclimação (7 dias) girinos do grupo controle (C₇) tiveram amostras de sangue coletadas por punção cardíaca, com seringa heparinizada e então eutanasiados. Estes animais foram pesados, medidos e foi removido o fígado, o intestino (somente para determinar os parâmetros de condição nutricional), e parte do músculo caudal. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para determinação da atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST), e níveis de TBARS, um indicador de Lipoperoxidação (LPO). Os mesmos procedimentos foram utilizados depois do término do período de 14 dias para o grupo controle C₁₄ e aos grupos expostos aos herbicidas (B; G; e BG). Nós comparamos estatisticamente os grupos C₇ e C₁₄ por Teste T Student para amostras independentes. Cabe ressaltar que nos três primeiros dias de aclimação observamos uma mortalidade de 25% dos animais. Ao compararmos os resultados obtidos para a maior parte dos parâmetros analisados, com exceção da glicose plasmática e da atividade das enzimas (SOD, CAT e GST) no fígado dos animais do grupo controle aclimação (C₇) e do controle tempo de cultivo total (C₁₄), não existiu diferença. Tal diferença nestes parâmetros pode indicar que durante o período de aclimação os girinos apresentaram um grau de estresse, possivelmente em virtude da adaptação as condições de cultivo o que justifica a taxa de mortalidade observada. Ressaltamos que para elaboração do artigo científico foram usados como controle os animais do grupo C₁₄, pois estes animais tem o mesmo tempo de vida que os animais expostos; o que aliado ao perfil de resposta, descrito acima, reforça tal escolha. Ao compararmos o grupo C₁₄ aos grupos expostos (B; G e BG) pelo teste de Kolmogorov-Smirnov detectamos uma distribuição não paramétrica para todos os parâmetros analisados sendo então, utilizado o Teste Kruskal-Wallis com complementar de Student-Newman-Keuls para detectar as diferenças entre os grupos, para um $p < 0,05$. Nós verificamos que houve taxa de sobrevivência de 91.7%, o que demonstra que as concentrações escolhidas dos herbicidas foram subletais; evidenciando assim, que o sistema de cultivo se mostrou

adequado à manutenção dos animais. Mesmo em baixas concentrações, semelhantes às encontradas em ambiente natural, estes herbicidas induziram alterações nos parâmetros analisados, principalmente no fator de condição específico ($K_{\text{intestinal}}$); nos níveis de triglicérides, de ácido úrico e de corticosterona plasmáticos; e na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e primordialmente a GST modulando os níveis de peroxidação lipídica no fígado e músculo caudal. Estas alterações parecem estar ligadas a um incremento da demanda energética na tentativa de manter a homeostase e garantir a sobrevivência dos animais; diminuindo assim, a energia disponível para o crescimento e a metamorfose o que pode comprometer o ciclo de vida adulto. Podemos sugerir que a mistura de sulfentrazone e glifosato parece ser mais lesiva aos animais, principalmente pela manutenção e diminuição drástica dos níveis de atividade da Glutathione S-transferase no fígado e no músculo caudal, respectivamente.

ABSTRACT

Pesticides are widely used in agriculture, among them there are the triazines (atrazine, cyanazine, propazine, simazine, terbuthylazine, tetrazine), the phosphonated amino acids (glyphosate), the benzenamines (phenylamine, phenylenediamine, dinitroaniline, pedimetalin), organophosphates (fenitrothion), the phenyl pyrazoles (fipronil) e triazolones (sufentrazone). Therefore, they widely use of them is one of the factors which affects amphibians development, reproduction and survival. Among the pesticides most used worldwide, included in Brazil, are herbicides. However, its toxic effects in animals and plants have not been yet sufficiently study. This work aimed to study the effect of isolated and mixture of Boral[®] and Glifosato[®] herbicides on the biochemical composition and oxidative balance in the liver and muscle; levels of glucose, uric acid and corticosterone in plasma, and nutritional condition factors in tadpoles of bullfrogs (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). Was used sixty tadpoles in prometamorphosis stage, no apparent members, acquired in a frog farm, and these, weighed, measured and distributed in tanks under controlled temperature (23°C), photoperiod (12h light: 12h dark) constant aeration, fed with commercial rations for seven days (C₇). After this, some animals continued under these conditions (C₁₄) e another it was divided into three groups which will be exposed to Boral[®] 500 SC (sulfentrazone: 130µg/L), to Glifosato[®] (glyphosate: 234µg/L) and to mixture Boral[®] 500 SC and Glifosato[®] (130µg/L + 234µg/L, respectively) for seven days. After the acclimation period (7 days) tadpoles of control 7 group had blood samples collected by cardiac puncture with heparinized syringe, then euthanized. They was weighed, measured and removed the liver, intestine (only to determinate an index), and muscle tissue. The tissues were immediately freeze in liquid nitrogen and homogenized for determination of activity of the enzymes Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione S-transferase, e TBARS levels, an indicator of Lipid Peroxidation (LPO, Lipid Peroxide Levels). The same procedures will used after the exposure period ending in animal control 14 days (C₁₄) and the exposed groups to herbicides (B, G and BG groups). We statistically compared the treatment groups C₇ e C₁₄ (Student T test for independent sample), as well as the control groups (C₁₄ e exposed). We observed on the three first acclimation days an animal mortality of 25%. We compared this percentage to major part of parameters analyzed, except glucose plasmatic and liver enzymes activity (SOD, CAT and GST) of groups acclimation control (C₇) and control 14 days (C₁₄) and this comparison was not different statistically. This difference in parameters can indicate that during the acclimation period the tadpoles showed a stress level, possibly because of adaptation process to culture conditions that justify the mortality percentage observed. We highlight that to scientific paper elaboration were used as control the animals of C₁₄ group, because this animals has the same time of life that the exposed animals and allied to answer to adaptation process reinforces this choice. We compared the C₁₄ group with exposed groups (B, G and BG groups) using Kolmogorov-Smirnov Test and we detected a non-parametric distribution to all parameters analyzed, so we used the Kruskal-Wallis Test and Student-Newman-Keuls Test a posteriori, to detect the differences between the groups to p<0,05. We verify a survey of 91.7%, those demonstrate that chosen herbicides concentrations was sub-lethal, Thus showing that the cultivation system was adequate to maintenance of animals. Even in low concentrations, similar of those found in natural environment, this herbicides induced changes in parameters analyzed, mainly in specific conduction level (K_{intestine}); in triglycerides levels, acid uric and corticosterone plasmatic, and in SOD

CAT and GST antioxidants enzymes activity, primordially the GST modeling the lipid peroxidation levels in liver and muscle tissues. This alterations looks linked to an increment of energy demand in an attempt to maintain homeostasis and ensure the survival of the animals, decreasing the energy available for growth and metamorphosis, which may compromise the adult life cycle. We suggest that sulfentrazone and glyphosate mixture seems to be more harmful to animals, mainly by the maintenance and drastic reduction of the levels of Glutathione S-transferase activity in the liver and caudal muscle, respectively.

APRESENTAÇÃO GERAL

1. Introdução

No Brasil, a adoção de defensivos agrícolas, produtos fitossanitários, pesticidas, biocidas e agrotóxicos, têm sido marcados por controvérsias há anos. A legislação brasileira adotou e definiu o termo pesticida (Lei 7.802/89 e Decretos 98.816/90 e 4.074/2002) como: “*Entende-se por pesticidas as substâncias, ou mistura de substâncias, de natureza química que são destinadas a prevenir, destruir ou repelir, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico ou de vida animal ou vegetal, que seja nociva às plantas e animais úteis, seus produtos e subprodutos e ao homem*” (Spadotto et al., 2004). Contudo, alguns xenobióticos têm o potencial de causar danos mesmo em concentrações extremamente baixas a organismos não alvos como também ao meio ambiente, sendo assim, o que é tradicionalmente considerado como uma baixa concentração de contaminante, não garante que os riscos biológicos não existam.

No Brasil, dentre os químicos agrícolas utilizados, segundo Coutinho *et al.* (2005), destacamos as triazinas (atrazina, cianazina, propazina, simazina, terbutilazina, trietazinas), os aminoácidos fosfonados (glifosatos), as benzenaminas (fenilaminas, fenilenodiaminas, dinitroanilinas, pedimetalina), os organofosforados (fenitrotion), e os fenilpirazóis (fipronil) devido ao seu uso excessivo é um dos fatores que afetam o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de anfíbios. Destaca-se também que, segundo Spadotto et al. (2006), uma enorme quantidade desses químicos agrícolas têm sido aplicados na mesma área de plantação potencializando estas características.

Atualmente, os herbicidas empregados na agricultura apresentam um grande potencial de contaminação dos recursos hídricos em virtude de suas características, dentre as quais podemos citar: o alto potencial de deslocamento (lixiviação); a persistência no solo; a moderada solubilidade em água, com uma persistência variada dependendo das condições físicas e químicas deste meio; uma adsorção moderada à matéria orgânica presente no solo, com potencial de fixação aos solos e sedimentos, além do potencial de alcance do lençol freático (Moura et al., 2008).

Estressores antropogênicos no ambiente como agroquímicos aumentam consideravelmente fatores que podem diminuir a resposta imune de anfíbios aos agentes

patogênicos, aumentando a prevalência de doenças nesses animais (Carey et al., 1999; Christin et al., 2013). Por exemplo, a exposição de anfíbios ao herbicida atrazina, mesmo em baixas concentrações, prejudica as defesas antivirais desses animais (Sifkarovski et al., 2014). Sabe-se que o uso excessivo de herbicidas tem sido destacado como um dos fatores responsáveis por afetar diretamente o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência de populações de anfíbios no mundo (Blaustein e Johnson 2003). A maior causa do declínio de anfíbios parece ser a perda de habitat, mas vários outros motivos têm sido propostos, dentre esses predadores, parasitas, doenças, radiação UV e pesticidas (Kiesecker et al., 2001). Patógenos têm implicado no declínio populacional de anfíbios (Fisher et al., 2009), sendo que estressores antropogênicos no ambiente aumentam fatores que podem diminuir a resposta imune de anfíbios a agentes patogênicos, e aumentam a prevalência de doenças nesses animais (Carey et al., 1999; Christin et al., 2013).

Dentre os herbicidas utilizados no Brasil, neste trabalho focamos no Boral[®] 500 SC e no Glifosato[®] por serem amplamente utilizados em lavouras nas regiões de planície e planalto do Rio Grande do Sul, onde são encontrados animais não-alvo desses xenobióticos. O herbicida sulfentrazone (2',4'-dichloro-5-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl) é utilizado em plantações (por exemplo, soja) e plantas ornamentais (USEPA, 2009), por esse ser um herbicida de amplo espectro controlando folhas largas e gramíneas (Vidal, 2002). A meia-vida do sulfentrazone em solo, de acordo com Hatzios (1998), varia de 110 a 280 dias, dependendo do tipo de solo e das condições ambientais. A rota primária para a dissipação deste herbicida em solo é por degradação microbiana (Hatzios, 1998). Passos et al. (2013) relataram que solos com pouca argila e matéria orgânica aumentam a probabilidade de contaminação futura por sulfentrazone em lavouras. Há poucos estudos sobre os efeitos de sulfentrazone em espécies aquáticas não-alvo. A agência de proteção ao meio ambiente dos Estados Unidos, USEPA, registrou e realizou estudos do sulfentrazone que indicaram que plantas aquáticas vasculares não-alvo são bastante suscetíveis ao sulfentrazone, seguido por fitoplâncton, invertebrados aquáticos e peixes (USEPA, 2009) e Hayes (2006) relatou que herbicidas

como Boral[®] 500 SC, em estágios larvais de anfíbios pode levar a desregulação endócrina.

O herbicida Glifosato[®] tem como princípio ativo o glifosato, que é utilizado principalmente, em plantações de café, cana-de-açúcar, algodão, arroz, milho e soja. O glifosato (isopropilamida de N (fosfometil) glicina) é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Quanto à absorção, é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes) e translocado, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos. Com relação à sua solubilidade em água, o glifosato é altamente solúvel, apresentando valor de 11.600ppm a 25°C (Kollman e Segawa, 1995), não persistente no ambiente, sem potencial de bioacumulação e com potencial para adsorção no solo. O glifosato possui meia-vida entre 7 e 70 dias em água (Ferrees e Sarcinelli 2009; Giesy et al., 2000). As formulações comerciais do glifosato utilizam o surfactante polioxietilenoamino (POEA) para aumentar a eficácia dos ingredientes ativos e promotores de penetração na cutícula da planta (Brausch e Smith, 2007; Jiraungkoorskul et al., 2002). Contudo, é importante salientar que o surfactante POEA é mais tóxico que o próprio glifosato (Brausch et al., 2007; Giesy et al., 2000; Perkins et al., 2000).

Por meio de testes ecotoxicológicos são fornecidas informações sobre o perigo potencial dos efeitos de uma substância tóxica aos organismos. Esses podem incluir tanto a letalidade, quanto efeitos subletais, tais como, alterações no desenvolvimento, crescimento, reprodução, mutagênese, teratogênese, carcinogênese, e desordens comportamentais e funcionais (Baudo, 1987). Os testes de toxicidade consistem basicamente na exposição (aguda ou crônica) de organismos a substâncias potencialmente tóxicas, visando à observação e a análise das respostas desses à substância testada. Bioensaios permitem as informações físico-químicas serem complementados com informações biológicas, a fim de determinar, entre outros aspectos, as consequências da exposição de organismos a ambientes poluídos (Ossana et al., 2013). Embora os herbicidas tenham sido projetados para atuarem em espécies de plantas, há evidências que esses químicos também estão ligados a diversas mudanças

em parâmetros bioquímicos e fisiológicos em comunidades de anfíbios (Ezemonye e Tongo, 2009).

Os indivíduos pertencentes à família Ranidae apresentam distribuição natural cosmopolita, com exceção ao Sul da América do Sul e à maioria da Austrália. A maioria dos ranídeos são indivíduos de médio a grande porte (até 180mm³), e têm reprodução, normalmente, em lagos ou lagoas e os ovos são depositados em ninhos de espuma ou como filmes superficiais nos corpos de água. Os indivíduos dessa família têm metamorfose, normalmente, de vários meses (Vitt e Caldwell, 2009). Efeitos tóxicos dos metabólitos reativos dos xenobióticos parecem ser neutralizados com maior eficiência em anfíbios nos estágios mais avançados de desenvolvimento (Bucciarelli et al., 1999).

A espécie *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 tem o nome popular rã-touro, e é uma espécie de ranídeo originária da América do Norte, tendo sido introduzida no Brasil na década de 30, para cultivo comercial, em razão da grande demanda de sua carne na culinária e da utilização da pele em subprodutos, como o couro (Culley, 1981, Cunha e Delariva, 2009, Silva *et al.*, 2016). É considerada uma das espécies invasoras com maior potencial impactante na diversidade natural no mundo. Estudos anteriores demonstraram que essa espécie é resistente a fatores de estresse externos e adapta-se às condições laboratoriais, além do potencial de ocupação de uma grande variedade de habitats. Dessa forma rãs-touro oferecem um valioso indicador à análise de saúde dos ecossistemas e tem sido utilizada como um modelo em testes toxicológicos (Rissoli *et al.*, 2016, Rollins-Smith, 2017, Strong *et al.*, 2017). Dentre os critérios de escolha de rã-touro como animal modelo ressalta-se sua fácil aquisição (disponível comercialmente), o tamanho corporal enquanto girino com a possibilidade de uso de um número reduzido de animais para obterem-se quantidades adequadas de diferentes tecidos, o que aumenta as possibilidades de análise (Costa *et al.*, 2008; Dornelles e Oliveira, 2016, 2014).

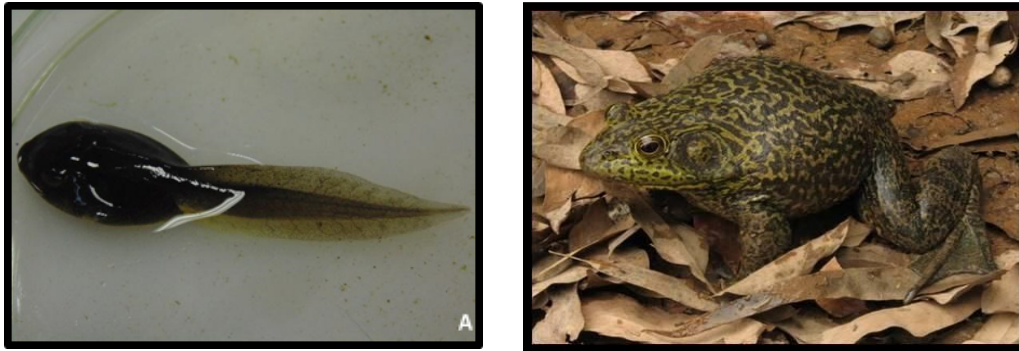


Figura 1: Indivíduos na fase larval (A) e adulta da rã-touro (B), *Rana catesbeiana*.
Créditos: Anike L. L. Wilkens e Márcio Borges Martins.

Girinos apresentam várias vantagens como modelos de estudo, sendo usualmente fáceis de detectar e coletar no campo. Além disso, vivem em habitats delimitados, presentes em grande número e esses às vezes são a única evidência da ocorrência de espécies secretas ou espécies fora do período reprodutivo (Grosjean et al., 2015). Em relação às outras taxas de animais, estudos ecotoxicológicos em anfíbios são escassos, até mesmo em espécies de anfíbios que enfrentam ambientes poluídos e/ou declínio populacional (Lau et al., 2015).

Carey et al. (2001) apontam que há lacunas nas informações sobre o espaço-temporal das concentrações de contaminantes que os anfíbios são expostos, das ações sinérgicas de vários químicos e das respostas fisiológicas de anfíbios à essa exposição. Estudos têm mostrado que herbicidas podem causar mudanças em parâmetro bioquímicos e funcionais em muitos anfíbios (Solomon et al., 2008, Van Der Kraak et al., 2014, Mesléard et al., 2016; Rissoli et al., 2016). Pesticidas em anfíbios em estágios larvais podem causar um incremento da mortalidade, inclusive em diferentes concentrações de glifosato (Relyea, 2005). Efeitos letais e subletais de herbicidas baseados em glifosato têm sido demonstrados em campo e laboratório quando os animais são expostos a concentrações da ordem de ppm (Howe et al., 2004, Comstock et al., 2007, Relyea e Jones, 2009). Em rãs (*Lithobates sylvaticus*), dados da expressão de genes (nível de RNAm) sugerem que herbicidas baseados em glifosato tem o potencial de alterar vias hormonais durante o desenvolvimento dos girinos (Lancôt et al., 2013).

Os radicais livres são átomos ou molécula com elétrons desemparelhados e existência independente, podendo ser cátions, ânions ou de carga neutra (Hermes-Lima, 2004). Os radicais livres estão presente em materiais biológicos e há teorias sobre estarem relacionados com processos mutagênicos (Simic, 1988, Akaike, 2001, Belló-Klein, 2002, Edenharder e Grünhage, 2003, Kauppila e Stewart, 2015).

Quando centrados no Oxigênio (O₂) são gerados a partir de compostos endógenos que, ao metabolizar determinados compostos exógenos ao organismo também podem gerar outros radicais livres (Llesuy, 2002). O oxigênio é convertido em várias formas, as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que incluem não só os radicais livres mas também moléculas derivas que não apresentam elétrons desemparelhados, como p. ex. os peróxidos. Várias enzimas removem estas espécies reativas, incluindo peroxidases, catalases e superóxido dismutases, mas o excesso de ERO's pode apresentar efeitos como a peroxidação. A peroxidação é um fenômeno fisiológico, importante para várias funções celulares, mas quando ocorre de modo muito exacerbado, esta pode causar dano oxidativo, dano à proteínas e ao DNA (Barreiros e David, 2006).

O desequilíbrio do status celular redox causado, muitas vezes pela exposição à contaminantes, pode conduzir ao estresse oxidativo, através da formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ERO's), levando à inatividade enzimática, dano ao DNA, apoptose celular, mutagênese, carcinogênese entre outras alterações como diferentes patologias (Jones, 2006, Lushchak, 2011, Sies, 1993).

O estresse oxidativo vem sendo reportado como atuante em uma parte importante da toxicidade de vários xenobióticos, inclusive os herbicidas que podem conduzir a alterações de DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (Coltro, 2015, Dornelles e Oliveira, 2016, 2014, Yin et al., 2014, Zanette et al., 2015).

Níveis ambientais de inseticida quinalpos podem causar dano oxidativo e perda da capacidade antioxidante em peixes (*Cyprinus carpio*). Isso pode reforçar o uso deste parâmetro, assim como aqueles ligados as defesas anti-oxidantes, como biomarcadores para avaliação da contaminação por pesticidas (Hemalatha et al., 2015). O aumento dos níveis de lipoperoxidação (LPO, da sigla em inglês *Lipid Peroxide Levels*) é um dos

maiores contribuintes para a perda de função celular durante o estado de estresse oxidativo e tem sido empregado como um biomarcador para estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro* em diferentes modelos experimentais (Hermes-Lima, 2004, Hermes-Lima et al., 1995, Nunes et al., 2015). Em embriões de zebrafish foi demonstrado que os químicos arsênico e atrazina são potencialmente teratogênicos e genotóxicos, podendo levar a estresse oxidativo, sendo esses efeitos potencializados pela interação tóxica entre os dois contaminantes (Adeyemi et al., 2015).

Radicais livres produzidos constantemente durante os processos metabólicos estão relacionados com o desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, os quais limitam os níveis intracelulares e impedem a indução de danos no organismo. Os antioxidantes agem inibindo e reduzindo os radicais livres nas células (Liochev, 2013). Dentre as muitas enzimas antioxidantes que são importantes para neutralizar a produção de ERO's podemos destacar a Superóxido Dismutase (SOD) que converte superóxido radical (O_2^-) para H_2O_2 , a Catalase (CAT) e a Glutaciona peroxidase (GPx), que reduzem os peróxidos a água, sendo a CAT específica para peróxidos de hidrogênio e a GPx que atua tanto sobre peróxidos orgânicos quanto inorgânicos (Yin et al., 2014). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem várias substâncias de baixo peso molecular de natureza lipofílica, como a vitamina E, o beta caroteno, os estrógenos; ou de antioxidantes de natureza hidrossolúvel, como a glutaciona, o ascórbico e o ácido úrico que interrompem a propagação de reações auto-catalíticas causadas pelos radicais ou espécies reativas (Zanette et al., 2015).

A exposição à xenobióticos pode ser associada ao incremento da expressão ou atividade de enzimas de biotransformação, como por exemplo, as Glutacionas S-transferases. A biotransformação de componentes orgânicos pode ser em linhas gerais categorizada em duas fases principais: a epoxidação/hidroxilação dessas moléculas (reações de fase I) e a conjugação do xenobiótico com componentes endógenos como a glutaciona (GSH) (reações de fase II). As enzimas da família das Glutacionas S-transferases (GSTs) conjugam a GSH com componentes eletrofílicos e estão também, envolvidas com a proteção celular contra uma ampla gama de endobióticos, xenobióticos e subprodutos do metabolismo oxidativo (Boutet et al., 2004b).

Em anfíbios, os corticoides como o glicocorticoide Corticosterona agem de maneira sinérgica com os hormônios da tireoide na pró-metamorfose, conforme tabela de Gosner (1960), podendo assim ter um importante papel na regulação hormonal. Os corticoides estão relacionados ao metabolismo de carboidratos e proteínas em anfíbios nos estágios de larva e nos indivíduos adultos (Wright et al., 2003). Os hormônios corticosteroides (cortisol e corticosterona) agem no fígado, músculo e tecido adiposo para suprir o organismo com combustíveis para uma iminente situação de estresse entre eles o de atividade intensa. Este hormônio tem uma ação relativamente lenta, alterando o metabolismo, mudando os tipos e as quantidades de certas enzimas que são sintetizadas nas suas células-alvo (Nelson e Cox, 2014). Como há redução dos depósitos de proteínas em praticamente todas as células corporais, exceto no fígado, onde os níveis de proteínas hepáticas são aumentados, pode haver a redução do transporte de aminoácidos para os tecidos extra-hepáticos.

O cortisol também parece exercer um efeito direto sobre o aumento da oxidação de ácidos graxos nas células; modulando também, o sistema imunológico atuando como agente anti-inflamatório e imunossupressor em anfíbios e mamíferos (Moyes e Schulte, 2010). O deslocamento de corticosterona por herbicidas como atrazina e inseticidas como fenitrotiona, afetam a relação total livre de corticosterona, havendo um aumento dessa e conseqüentemente levando a um rompimento indireto na resposta normal ao estresse (Hernández et al., 2014).

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

Já o tecido muscular é formado, principalmente, por proteínas e é o órgão responsável, pelo fornecimento da força contrátil para o movimento (Moyes e Schulte, 2010). Hill et al. (2012) afirmam que, no músculo, o ATP é produzido por três mecanismos principais: pela transferência do fosfato de alta energia da creatina para o ADP; pela glicólise e pela fosforilação oxidativa. Sabendo que o estresse leva ao catabolismo de proteínas, como forma de suprir a elevada demanda energética da qual o corpo está necessitando (Sahib et al., 1984), sendo um tecido de baixa taxa metabólica. Considera-se que o supracitado modelo experimental tem hábito alimentar generalista e comportamento predatório voraz, analisar o músculo fornece informações sobre o armazenamento de nutrientes e ação em tecidos de baixa taxa metabólica (longo prazo). Um dos eventos mais importante durante uma das fases do ciclo de vida dos anfíbios, a metamorfose, é a absorção da cauda, visto que esta corresponde a uma grande parte do corpo dos girinos (Gonçalves, 2013). A análise de possíveis alterações provocadas ao tecido muscular de girinos de rã-touro a partir da exposição de herbicidas se justifica pelo papel crucial da cauda para os girinos (nutrição durante a metamorfose, locomoção e exploração ambiental), sendo que alterações neste tecido implicariam prejuízo no ciclo de vida e na sobrevivência destes animais, de uma forma geral (Dornelles e Oliveira, 2016, 2014).

Pesquisas com herbicidas em girinos de rã-touro mostraram que nas brânquias, fígado e músculo as reservas energéticas foram severamente depletadas depois de expostos à três diferentes herbicidas Facet[®] (princípio ativo quinclorac), Roundup[®] (princípio ativo glifosato) e Primoleo[®] (princípio ativo atrazina), além de conduzirem a um incremento da lipoperoxidação (Dornelles e Oliveira, 2016, 2014). Em girinos, concentrações subletais de glifosato alteraram drasticamente as respostas anti-predação desses animais, com potencial consequência negativa para a população (Moore *et al*, 2015). A toxicidade do glifosato em anfíbios tem sido o principal foco de pesquisas recentes que sugerem que há um sensível aumento desta, quando comparadas com outros vertebrados, devido à sua história de vida e dependência de ambos ambientes, terrestre e aquático (Annett et al., 2014). Coltro (2015) demonstrou que concentrações extremamente baixas do herbicida Facet[®] (quinclorac) causou alteração em diversos parâmetros nutricionais como, por exemplo, crescimento com diminuição da taxa de

ganho de massa e comprimento corporal, índice K e $K_{\text{hepático}}$. Estes fatores nutricionais ou de condição traduzem a relação entre a massa total do animal e seu comprimento (K) e a massa de um órgão, no caso, o fígado e intestino, em relação também ao comprimento do animal ($K_{\text{hepático}}$ e $K_{\text{intestinal}}$), além do índice hepatossomático, podendo refletir o balanço energético dos animais (Nunes et al., 2015, 2011).

O grande potencial agroindustrial do Rio Grande do Sul, com cultivo de diversas frutas, além de extensas áreas de plantação de grãos como soja e arroz, cria a necessidade de ampliar o número de marcadores bioquímicos e funcionais frente ao uso de tóxicos como Boral[®] SC 500 e Glifosato[®], amplamente utilizados nas lavouras.

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da mistura dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] sobre os níveis de proteínas, glicose, triglicerídeos, ácido úrico e corticosterona plasmáticos; o balanço oxidativo do fígado e do músculo caudal; e sobre parâmetros de condição nutricional em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*).

2. Desenho Experimental

Para o desenvolvimento deste estudo foram adquiridos 80 girinos da espécie *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, provenientes do ranário Ranasul (Imbé, RS, Brasil, 29°56'57.5"S, 50°07'52.0"W). Todos os girinos com cerca de 3 meses de vida, em estágio pró-metamórfico e com ausência de membros, como já padronizado por nosso laboratório (Coltro et al., 2017, Dornelles e Oliveira, 2016, 2014). Sendo uma espécie exótica de fácil manipulação e adaptação às condições laboratoriais de acordo com Stebbins e Cohen (1995), o estudo com girinos de *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 torna-se de mais fácil exequibilidade. Uma vez que houve manipulação e sacrifício dos girinos o projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA: número 15/00471).

Os animais foram transportados em sacos plásticos aerados até o Laboratório de Fisiologia Comparada, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde houve a medição, pesagem, sendo estes fotografados individualmente.

O protocolo empregado neste estudo foi padronizado por Dornelles (2013) e posteriormente publicado em 2014 por Dornelles e Oliveira; onde os animais foram colocados em cubas de 5 litros para aclimatação com água decolada, aeração constante,

pH de 7,4, temperatura média de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo controlado (12:12h de claro e escuro) e alimentados com a mesma ração proteica (38% de proteína) utilizada no ranário. Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, concentração de íons, oxigênio dissolvido e nitrogênio) dos aquários foram monitorados em 2 momentos, sendo eles às 09 e 17 horas no primeiro, no quarto e sétimo dia, tanto no período de aclimatação como de exposição aos agroquímicos, com o uso de aparelho multiparâmetros (SANXIN Modelo SX751).

Cabe ressaltar que nos três primeiros dias de aclimatação observamos a morte de 20 animais (mortalidade=25%). Os aquários foram inspecionados duas vezes ao dia, sendo retirados os animais mortos e, trocada 2/3 da água do aquário onde foram constatados óbitos; após este período (3 dias) não observamos mais mortalidade entre os animais.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, contendo 16 animais em cada grupo, sendo 6 aquários para cada grupo e 2-3 animais em cada aquário. Após o período de aclimatação (7 dias) seis girinos do grupo Controle 7 (C_7) tiveram amostras de sangue coletadas por punção cardíaca, com seringa heparinizada, sendo atordoados em banho de gelo e, então eutanasiados por decapitação. Após estes foram pesados, medidos e retirado o intestino, o fígado e parte do músculo caudal, sendo os tecidos imediatamente congelados em nitrogênio líquido para a determinação dos parâmetros bioquímicos e de nutrição. Os mesmos procedimentos foram empregados após o término do período de exposição nos animais dos grupos controle 14 (C_{14}) dias e expostos aos herbicidas (Boral[®] 500 SC e Glifosato[®]).

Após comparação, por teste T de Student para amostras independentes, entre os resultados obtidos para os animais do grupo controle sete dias (C_7) e controle quatorze dias (C_{14}) verificamos que para a maioria dos parâmetros analisados não existiu diferença entre o grupo controle 7 dias (C_7 - aclimatação) e o grupo controle 14 dias (C_{14} - período total de cultivo), ambos mantidos nas mesmas condições de cultivo (Tabela 1). Salientamos que para os níveis de glicose plasmática encontramos uma variação significativa, onde observamos um aumento de 2,917 vezes de seus níveis totais no grupo C_{14} (14,181mg/dL) em relação ao grupo C_7 (4,862mg/dL). Da mesma forma, para os níveis de atividade da Superóxido Dismutase (SOD), onde observamos

um aumento de 2,438 vezes de seus níveis no grupo C₁₄ (1,241U/mg proteína) em relação ao grupo C₇ (0,509U/mg proteína); da Catalase (CAT) onde observamos um aumento de 1,679 vezes de seus níveis no grupo C₁₄ (5,589 pmoles/mg proteína.min) em relação ao grupo C₇ (3,328pmoles/mg proteína.min) e da Glutathione S-Transferase (GST) onde observamos um aumento de 1,793 vezes de seus níveis no grupo C₁₄ (7,088pmoles/mg proteína.min) em relação ao grupo C₇ (3,951pmoles/mg proteína.min), conforme Tabela 1. Ao compararmos os valores da massa corporal obtidos para os animais observamos que em relação à massa corporal inicial (animais ao chegarem ao laboratório), o grupo C₇ perdeu 30% de massa.

Tais diferenças podem indicar que durante o período de aclimação os girinos apresentaram um grau de estresse, possivelmente em virtude da adaptação as condições de cultivo. Cabe ressaltar que para elaboração do artigo (Capítulo 1) foram usados como controle os animais do grupo C₁₄, pois estes animais tem o mesmo tempo de vida que os animais expostos; o que aliado ao perfil de resposta, descrito acima, reforça tal escolha.

Tabela 1: Resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados no plasma e nos tecidos hepático e muscular de animais do Grupo Controle 7 dias (C₇) e Controle 14 dias (C₁₄). Marcados com negrito e asterisco (*) indicam diferenças significativas entre os grupos C₇ e C₁₄, para um p<0,05, através de teste T de Student para amostras independentes.

	C ₇	C ₁₄
<i>Fatores de condição nutricional</i>		
Índice K	5,998±0,37 g/mm	6,743 ± 0,51 g/mm
Fator K _{hepático}	0,196±0,02 g/mm	0,297 ± 0,05 g/mm
Fator K _{intestinal}	0,935±0,25 g/mm	0,874 ± 0,1 g/mm
IHS	3,35 ± 0,42 %	4,555 ± 0,75 %
<i>Plasma</i>		
Triglicerídeo (TGL)	42,179±5,67 mg/dL	39,34 ± 2,36 mg/dL
Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)	14,9601±6,58 mg/dL	7,7996 ± 0,41 mg/dL
Proteínas Totais	1414,576±621,66 mg/dL	2272,401 ± 799,14 mg/dL
Ácido Úrico	0,267±0,03 mg/dL	0,293 ± 0,01 mg/dL
Glicose*	4,862±0,68 mg/dL	14,181 ± 3,15 mg/dL
Corticosterona	51,04±14,69 pg/mL	68,073 ± 16,92 pg/mL
<i>Fígado</i>		
Superóxido Dismutase (SOD)*	0,509 ± 0,03 U/mg proteína	1,241 ± 0,08 U/mg proteína
Catalase (CAT)*	3,328 ± 0,55 pmoles/mg proteína,min	5,589 ± 0,71 pmoles/mg proteína,min
Glutaiona S-Transferase (GST)*	3,951 ± 1,05 mm3oles/mg proteína,min	7,088±0,63 mm3oles/mg proteína,min
Lipoperoxidação (LPO)	3,274 ± 0,56 µmoles/mg proteína	4,145 ± 0,43 µmoles/mg proteína
<i>Músculo</i>		
Superóxido Dismutase (SOD)	6,175 ± 1,4 U/mg proteína	8,181 ± 1,38 U/mg proteína
Catalase (CAT)	4,955 ± 1,84 pmoles/mg proteína,min	4,52 ± 0,78 pmoles/mg proteína,min
Glutaiona S-Transferase (GST)	4,228 ± 1,3 mm3oles/mg proteína,min	3,037 ± 0,22 mm3oles/mg proteína,min
Lipoperoxidação (LPO)	18,075 ± 6,32 µmoles/mg proteína	13,478 ± 2,89 µmoles/mg proteína

Os 60 girinos que restaram vivos, após os sete dias de aclimação, foram distribuídos e organizados em 4 grupos experimentais: Controle 14 dias (C₁₄); exposto ao sulfentrazone; ao glifosato e, ao sulfentrazone mais glifosato, conforme explicitado no Quadro 1. Neste estudo foi utilizada a formulação comercial Boral[®] 500 SC (com sulfentrazone como princípio ativo em uma proporção de 500g/Kg, Basf) na concentração de 130µg por litro de água do aquário; a formulação comercial de Glifosato[®] (com glifosato como princípio ativo, em uma proporção de 360 g/L), na concentração de 234µg por litro de água dos aquários; sendo o herbicida adicionado aos aquários no oitavo dia após o início da aclimação. Os agroquímicos foram dissolvidos em água destilada para formulação de uma solução mãe da qual retiraremos alíquotas que foram misturadas a água do aquário e, assim obtermos as concentrações já especificadas.

As concentrações escolhidas foram baseadas em valores mínimos e máximos encontrados na água em ambiente natural para o glifosato, como citados por Dornelles e Oliveira (2014), como permitidas na água considerada potável para o sulfentrazone. Os herbicidas já constam no Laboratório de Fisiologia da Conservação tendo sido comprados de acordo com a legislação para outros trabalhos já realizados no laboratório com seu manuseio já definido e aprovado. Ressaltamos que o SESMT (Setor de Segurança e Medicina do Trabalho da PUCRS) forneceu os EPI's e foi responsável pelo recolhimento dos resíduos químicos.

Quadro 1. Organização do número de animais em aquários, tempo de experimento e relação de agroquímicos para cada grupo.

Aquário	Número de Animais (inicial)	Número de Animais (final)	Tempo de aclimação (dias)	Tempo de exposição (dias)
Grupo C14 (Controle 14 dias)	12	9	14	-
Grupo B: Boral [®] 500SC (Sulfentrazone)	13	12	7	7
Grupo G: Glifosato [®] (Glifosato)	13	12	7	7
Grupo BG: Boral [®] 500SC + Glifosato [®] (Sulfentrazone + Glifosato)	16	16	7	7
Número Total de Animais	60	55	-	-

Obs.: foi observada uma mortalidade de 8,3% (4 animais), sendo 3 girinos do grupo C14 e 1 do grupo B e 1 do grupo G.

Assim, na presente dissertação de mestrado optou-se por apresentar os resultados em forma de artigo (Capítulo 1), denominado: “Efeito dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] isolados e em mistura sobre marcadores do metabolismo, do balanço oxidativo, e de parâmetros nutricionais de girinos de *Rana catesbeiana* Shaw 1802”, o qual será traduzido e encaminhado à revista Toxicology para uma possível publicação.

Uma conclusão geral que elucida acerca de todo o projeto realizado, com considerações envolvendo os resultados obtidos e o Anexo I que apresenta as normas de padrão de elaboração do artigo para a submissão à revista escolhida são apresentados no Capítulo 2.

Referências Bibliográficas

- ADEYEMI, J.A.; DA CUNHA MARTINS-JUNIOR, A.; BARBOSA, F. Jr. 2015. **Teratogenicity, genotoxicity e oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic e atrazine.** Comparative Biochemistry Physiology C Toxicology e Pharmacology. 13:172-173 C:7-12.
- AKAIKE, T., 2001. **Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation.** Reviews in medical virology. 11(2), 87-101.
- ANNETT, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. 2014. **Impact of Glyphosate and Glyphosate-based herbicides on the freshwater environment.** Journal of Applied Toxicology (34) 5: 458–479.
- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J. M., DAVID, J.P., 2006. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química nova, 29(1), 113.
- BAUDO, R., 1987. **Ecotoxicological testing with *Daphnia*.** Instituto Italiano de Idrobiologia, v. 45, p. 461 -482.
- BLAUSTEIN, A.R., JOHNSON, P.T., 2003. **The complexity of deformed amphibians.** Frontiers in Ecology and the Environment, 1(2), 87-94.
- BOUTET, I., TANGUY, A., MORAGA, D., 2004b. **Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides.** Marine Biology, 146(1), 53-64.
- BRAUSCH, M.J. e SMITH, N.P. 2007. **Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory e field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 217-221.
- BRAUSCH, M.J.; BEALL, B.; SMITH, N.P. 2007. **Acute e sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*.** Bull Environ Contam Toxicol 78(6):510-4.
- BUCCIARELLI, T.; SACCHETTA, P.; PENNELLI, A.; CORNELIO, L.; ROMAGNOLI, R.; MELINO, S. 1999. **Characterisation of toad glutathione transferase.** Biochimica et Biophysica Acta 1431: 189–98
- CAREY, C., HEYER, W.R., WILKINSON, J., ALFORD, R.A., ARNTZEN, J.W., HALLIDAY, T., HUNGERFORD, L., LIPS, K.R., MIDDLETON, E.M., ORCHARD, S.A., Rand, A. S., 2001. **Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates.** Conservation Biology, 15(4), 903-913.
- CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. 1999. **Amphibian declines: an immunological perspective.** Dev Comp Immunol 23:459–472
- CHRISTIN, M.S., MÉNARD, L., GIROUX, I., MARCOGLIESE, D.J., RUBY, S., CYR, D., FOURNIER, M., BROUSSEAU, P., 2013. **Effects of agricultural pesticides**

on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. Environmental Science and Pollution Research, 20(2), 601-611.

COLTRO, M.D.L., 2015. **A influência do herbicida FACET® (Quinclorac) nos níveis de corticosterona, metabólitos plasmáticos e nas defesas antioxidantes do fígado de girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802)** (Master's thesis, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

COLTRO, M.L., DA SILVA, P.R., VALGAS, A.A.N., MIGUEL, C.M., FREITAS, B.S., OLIVEIRA, G.T., 2017. **Influence of the herbicide Quinclorac (Facet®) on corticosterone levels, plasma metabolites, and antioxidant balance in liver and muscle tissues of tadpoles of *Rana catesbeiana* Shaw, 1802.** Submetido: Water, Air & Soil Pollution.

COMSTOCK, B.A.; SPRINKLE, S.L.; SMITH, G.R. 2007. **Acute toxic effects of Round-up herbicide on wood frog tadpoles (*Ranasylvatica*).** Journal of Freshwater Ecology 22:705-7

COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; OLIVEIRA-NETO, A.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. 2008. **Oxidative stress biomarkers e heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original.** Ecotoxicology. 17(3):153-63.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, G.S.; GARBELLINI, G.S.; Do AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. 2005. **Pesticidas: Mecanismo de Ação, Degradação e Toxidez.** Pesticidas: R. Ecotológico. e meio ambiente, Curitiba, 15: 65-72

CULLEY, D.D.J. 1981. **Have we turned the corner in bullfrog culture?** Aquaculture Magazine 7:20-24.

CUNHA, E. R., & DELARIVA, R. L. (2009). **INTRODUÇÃO DA RÃ-TOURO, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): UMA REVISÃO.** SaBios-Revista de Saúde e Biologia, 4(2).

DORNELLES, M. F., OLIVEIRA, G. T., 2016. **Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits.** Environmental Science and Pollution Research, 23(2), 1610-1620.

DORNELLES, M.F. 2013. **Efeito dos herbicidas Atrazina, Glifosato e Quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).** Dissertação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil.

DORNELLES, M.F.; OLIVEIRA, G.T. 2014. **Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*).** Archives of environmental contamination and toxicology, 66:415-429.

EDENHARDER, R., GRÜNHAGE, D., 2003. **Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102.** Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 540(1), 1-18.

- EZEMONYE, L.; TONGO, I. 2009. **Lethal e Sublethal Effects of Atrazine to Amphibian Larvae**. Jordan J. Biol. Sci. 2(1): 29-36.
- FERNEES, NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. 2009. **Pesticides in drinking water: a risk assessment approach e contribution to the Brazilian legislation updating process**. Engenharia Sanitária Ambiental 14, 1:69-78.
- FISHER, M.C., GARNER, T.W., WALKER, S.F., 2009. **Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host**. Annual review of microbiology, 63, 291-310.
- GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. 2000. **Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide**. Reviews of Environmental Contamination e Toxicology 167:35-120.
- GONÇALVES, A.M. 2013. **Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- GOSNER, K.L. 1960 **A simplified table for staging anuran embryos e larvae with notes on identification**. Herpetologica 16:183-190.
- GROSJEAN, S.; OHLER, A.; CHUAYNKERN, Y.; CRUAUD, C.; HASSANIN, A. 2015. **Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles**. Case studies from Southeast Asia. Comptes Rendus Biologies (Elsevier). pii: S1631-0691(15)00093-1.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. 2006. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier
- HATZIOS, KK. 1998. **Supplement to Herbicide Handbook**. 7th ed. Weed Science Society of America, Lawrence, KS, USA
- HAYES, T.B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V.P.; MARJUOA, Y.; PARKER, J.; TSUI, M. 2006. **Pesticide mixtures, endocrine disruption, e amphibian declines: are we underestimating the impact?** Environ Health Perspect 114:40-50
- HEMALATHA, D.; AMALA, A.; RANGASAMY, B.; NATARAJ, B.; RAMESH, M. 2015. **Sublethal toxicity of quinalphos on oxidative stress e antioxidant responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio***. Environ Toxicol.
- HERMES-LIMA, M. 2004. **Oxygen in biology e biochemistry: role of free radicals**. In: Storey, K.B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation e Adaptation**. WileyLiss, New Jersey, 319-368.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. 1995. **Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation**. Free Radic. Biol. Med. 19:271-280.
- HERNÁNDEZ, S.E., SERNIA, C., BRADLEY, A.J., 2014. **Effect of atrazine and fenitrothion at no-observed-effect-levels (NOEL) on amphibian and mammalian corticosterone-binding-globulin (CBG)**. Toxicology letters, 230(3), 408-412.

- HILL, R.W.; WYSE, G. A.; EERSON, M. 2012. **Fisiologia animal**. (p. 894). Porto Alegre: Artmed
- HOWE, C.M.; BERRILL, M.; PAULI, B.D.; HELBING, C.C.; WERRY, K.; VELDHOEN, N. 2004. **Toxicity of Glyphosate-based pesticides to four North American frog species**. *Environmental Toxicology e Chemistry* 23:1928-1938.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. 2002. **Histopathological effects of Roundup, a Glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Science Asia* 28:121-127.
- JONES, D.P. 2006. **Redefining oxidative stress**. *Antioxidants e Redox Signaling* 8, 1865–1879.
- KAUPPILA, J.H.K., STEWART, J.B., 2015. **Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1847(11), 1354-1361.
- KIESECKER, J.M., BLAUSTEIN, A.R., BELDEN, L.K., 2001. **Complex causes of amphibian population declines**. *Nature* 410, 681–684.
- KOLLMAN, W. e SEGAWA, R. 1995. **Interim report of the pesticide chemistry database: environmental hazards assessment program**. Department of Pesticide Regulation.
- LANCTÔT, C., ROBERTSON, C., NAVARRO-MARTÍN, L., EDGE, C., MELVIN, S.D., HOULAHAN, J., TRUDEAU, V.L., 2013. **Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax® on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands**. *Aquatic toxicology*, 140, 48-57.
- LAU, E.T.C.; KARRAKER, N.E.; KENNETH, M.Y.L. 2015. **Temperature-dependent acut toxicity of Methomyl pesticide on larvae of three Asian amphibian species**. *Environmental Toxicology e Chemistry*. 30/87 (Toxicology); 52/216 (Environmental Sciences).
- LIOCHEV, S. I. (2013). **Reactive oxygen species and the free radical theory of aging**. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1-4.
- LLESUY, S.F., 2002. **Introducción y especies activas de oxígeno, estresse oxidativo e antioxidantes**. Argentina. Editora: ULBRA, 22, 32.
- LUSHCHAK, V.I. (2011). **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals**. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- MESLÉARD F., GAUTHIER-CLERC, M., LAMBRET, P., 2016. **Impact of the insecticide Alphacypermetrine e herbicide Oxadiazon, used singly or in combination, on the most abundant frog in French rice fields, *Pelophylax perezi***. *Aquatic Toxicology*. 176, 24-29.
- MOORE, H.; CHIVERS, D.P.; FERRARI, M.C.O. 2015. **Sub-lethal effects of Roundup™ on tadpole anti-predator responses**. *Ecotoxicology e Environmental Safety* 111:281-285.

- MOURA, M.A.M.; FRANCO, D.A.S.; MATALLO, M.B. 2008. **Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos**. Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária. 142-151.
- MOYES, C.D. e SCHULTE, P.M. 2010. **Princípios De Fisiologia Animal**. Porto Alegre: Artmed. 526-571.
- NELSON, D.L., COX, M.M., 2014. **Princípios de Bioquímica: Lehninger**. Artmed, Porto Alegre.
- NUNES, B.S., TRAVASSO, R., GONÇALVES, F., CASTRO, B.B., 2015. **Biochemical and physiological modifications in tissues of *Sardina pilchardus*: spatial and temporal patterns as a baseline for biomonitoring studies**. Frontiers in environmental science 3: 1-14
- NUNES, C.; SILVA, A.; SOARES, E.; GANIAS, K. 2011. **The use of hepatic e somatic indices e histological information to characterize the reproductive dynamics of Atlantic sardine *Sardina pilchardus* from the Portuguese coast**. *Mar. Coast. Fish* 3, 127-144. doi: 10.1080/19425120.2011.556911
- OSSANA, N.A.; CASTAÑÉ, P.M.; SALIBIÁN, A. 2013. **Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina)**. *Arch Environ Contam Toxicol* 65:486–497. doi: 10.1007/s00244-013-9920-6
- PASSOS, A.B.R., FREITAS, M.A.M., TORRES, L.G., SILVA, A.A., QUEIROZ, M. E.L., LIMA, C.F., 2013. **Sorption and desorption of sulfentrazone in Brazilian soils**. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(8), 646-650.
- PERKINS, P.J., BOERMANS, H.J., STEPHENSON, G.R., 2000. **Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay- *Xenopus***. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 940– 945. doi:10.1002/etc.5620190422
- RELYEA, R.A. 2005. **The Lethal Impacts of Roundup e Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles**. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 351–357
- RELYEA, R.A. e JONES, D.K. 2009. **The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians**. *Environmental Toxicology e Chemistry* 28:2004-20
- RISSOLI, R. Z., ABDALLA, F. C., COSTA, M. J., RANTIN, F. T., MCKENZIE, D. J., & KALININ, A. L. (2016). **Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles**. *Chemosphere*, 156, 37-44.
- RISSOLI, R.Z., ABDALLA, F.C., COSTA, M.J., RANTIN, F.T., MCKENZIE, D.J., KALININ, A.L., 2016. **Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles**. *Chemosphere*, 156, 37-44.
- ROLLINS-SMITH, L. A. (2017). **Amphibian immunity–stress, disease, and climate change**. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 111-119.

- SAHIB, I.K.A.; RAO, K.R.S.; RAO, K.V. 1984. **Effect of malathion on protein syntethic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters), as measured throught incorporation of 14C amino acids.** *Toxicol. Lett.* 20: 63-67
- SIES, H. 1993. **Strategies of antioxidant defense.** *European Journal of Biochemistry*, 215(2):213–219.
- SIFKAROVSKI, J.; GRAYFER, L.; DE JESÚS EINO, F.; LAWRENCE, B.P.; ROBERT, J. 2014. **Negative effects of low dose atrazine exposure on the development of effective immunity to FV3 in *Xenopus laevis*.** *Dev Comp Immunol.* 47(1):52-8. doi: 10.1016/j.dci.2014.06.012.
- SILVA, E.T.D., BOTH, C., FILHO, O.P.R., 2016. **Food Habits of Invasive Bullfrogs and Native Thin-Toed Frogs Occurring in Sympatry in Southeastern Brazil.** *South American Journal of Herpetology*, 11(1), 25-33.
- SIMIC, M.G. 1998. **Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 202(2), 377-386.
- SOLOMON, K.R., CARR, J.A., DU PREEZ, L.H., GIESY, J.P., KENDALL, R.J., SMITH, E.E., VAN DER KRAAK, G.J., 2008. **Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review.** *Critical reviews in toxicology*, 38(9), 721-772.
- SPADOTTO, C.A., 2006. **Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras.** Documentos, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente. 58, 20p.
- SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; de ERÉA, M.M., 2004. **Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).
- STEBBINS, R.C., COHEN, N.W., 1995. **A Natural History of Amphibians.** Princeton University Press, New Jersey
- Strong, R., Martin, F.L., Jones, K.C., Shore, R.F., Halsall, C.J., 2017. **Subtle effects of environmental stress observed in the early life stages of the Common frog, *Rana temporaria*.** *Scientific Reports*, 7.
- USEPA - US Environmental Protection Agency 2009. **Sulfentrazone registration review.** EPA-HQ-OPP-2009-0624. Washington, DC.
- VAN DER KRAAK, G.J., HOSMER, A.J., HANSON, M.L., KLOAS, W., SOLOMON, K.R., 2014. **Effects of atrazine in fish, amphibians, and reptiles: An analysis based on quantitative weight of evidence.** *Critical reviews in toxicology*, 44(sup5), 1-66.
- VIDAL, R.A. **Ação dos herbicidas.** Porto Alegre: Ribas A. Vidal, 2002. 89p
- VITT, L.J. e CALDWELL, J.P. 2009. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians e Reptiles.** Third Edition. Burlington, Massachusetts, U.S.A.: Academic Press.

WRIGHT, M.L., GUERTIN, C.J., DUFFY, J.L., SZATKOWSKI, M.C., VISCONTI, R.F., ALVES, C.D., 2003. **Developmental and diel profiles of plasma corticosteroids in the bullfrog, *Rana catesbeiana*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 135(4), 585-595.

YIN, X., JIANG, S., YU, J.; ZHU, G.; WU, H.; MAO, C. 2014. **Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, e lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles.** Environment Toxicology Pharmacology. 37(3):1229-35.

ZANETTE, J., MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A., 2015. **Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvises*: pollution and seasonal effects.** Marine Environmental Research, 103:74–79.

Capítulo 1

Artigo Científico: “Efeito dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] isolados e em mistura sobre marcadores do metabolismo, do balanço oxidativo, e de parâmetros nutricionais de girinos de *Rana catesbeiana* Shaw 1802” com os seguintes destaques (*highlights*):

- Incremento do $K_{\text{intestinal}}$ e dos TGL circulantes sugerem aumento da atividade alimentar
- Diminuição da corticosterona em girinos expostos ao glifosato e a mistura dos herbicidas pode comprometer a capacidade de resposta a situações de estresse
- Ácido úrico parece ser induzido em resposta ao estresse oxidativo, como resposta adaptativa do sistema antioxidante
- GST parece ser o principal componente antioxidante enzimático mobilizado
- Não observamos incremento da lipoperoxidação o que mostra modulação eficiente do sistema antioxidante
- A mistura de herbicidas apresenta um potencial mais lesivo aos girinos.

Efeito dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] isolados e em mistura sobre marcadores do metabolismo, do balanço oxidativo, e de parâmetros nutricionais de girinos de *Rana catesbeiana* Shaw 1802

Wilkens, A.L.L.¹, Valgas, A.A.N.^{1,2}; Rückheim, L.P.¹; Oliveira G.T.¹

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

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biologia Animal – Laboratório de Carcinologia

Autor correspondente:

Guendalina Turcato Oliveira

e-mail: guendato@pucri.br

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Dentre os agroquímicos mais utilizados mundialmente, inclusive no Brasil, estão os herbicidas. Seu amplo uso é um dos fatores que afetam o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos anfíbios. Contudo, seus efeitos tóxicos em animais não foram ainda suficientemente estudados. Dessa forma, neste trabalho objetivamos estudar o efeito isolado e em mistura dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] sobre os níveis de proteínas totais, ácido úrico, triglicerídeos, VLDL, glicose e corticosterona no plasma; o balanço oxidativo no fígado e músculo; e sobre parâmetros de condição nutricional em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). Para tanto, utilizamos sessenta girinos em estágio de pró-metamórfico (ausência de membros), adquiridos em ranário. Estes foram pesados, medidos e distribuídos em aquários sob condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12h luz:12h escuro), aeração constante, alimentados uma vez ao dia com ração comercial durante quatorze dias. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: Controle 14 dias (C_{14}), animais não expostos, e o restante foi dividido em três grupos sendo expostos a uma concentração de Boral[®] 500 SC (sulfentrazone: $130\mu\text{g/L}$), uma de Glifosato[®] (glifosato: $234\mu\text{g/L}$) e uma mistura de Boral[®] 500 SC e Glifosato[®], nas mesmas concentrações antes especificadas. Depois deste período os girinos tiveram amostras de sangue coletadas por punção cardíaca. Os animais foram pesados, medidos e foi removido o fígado, o intestino (somente para determinar os parâmetros de condição nutricional), e parte do músculo caudal. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para determinação da atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST), Superóxido Dismutase (SOD), e dos níveis de Lipoperoxidação (LPO). Nós verificamos que a mortalidade foi de 8,3%, o que demonstra que as concentrações escolhidas dos herbicidas foram subletais, e o sistema de cultivo foi adequado à manutenção dos animais. A partir do teste de Kolmogorov-Smirnov detectamos uma distribuição não paramétrica para todos os parâmetros analisados sendo então, utilizado o Teste Kruskal-Wallis com complementar de Student-Newman-Keuls para detectar as diferenças entre os grupos, para um $p < 0,05$. Nós verificamos que a houve taxa de sobrevivência de 91,7%, o que demonstra que as concentrações escolhidas dos herbicidas foram subletais; evidenciando assim, que o sistema de cultivo se mostrou

adequado à manutenção dos animais. Mesmo em baixas concentrações, semelhantes às encontradas em ambiente natural, estes herbicidas induziram alterações nos parâmetros analisados, principalmente no fator de condição específico ($K_{\text{intestinal}}$); nos níveis de triglicérides, de ácido úrico e de corticosterona plasmáticos; e na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e primordialmente a GST modulando os níveis de peroxidação lipídica no fígado e músculo caudal. Estas alterações parecem estar ligadas a um incremento da demanda energética na tentativa de manter a homeostase e garantir a sobrevivência dos animais; diminuindo assim, a energia disponível para o crescimento e a metamorfose o que pode comprometer o ciclo de vida adulto. Podemos sugerir que a mistura de sulfentrazone e glifosato parece ser mais lesiva aos animais, principalmente pela manutenção e diminuição drástica dos níveis de atividade da Glutathione S-transferase no fígado e no músculo caudal, respectivamente.

Palavras chave: Rã-touro. Antioxidantes. Lipoperoxidação. Toxicologia. Mistura de herbicidas.

1. Introdução

Atualmente, os herbicidas empregados na agricultura apresentam um grande potencial de contaminação dos recursos hídricos em virtude de suas características, dentre as quais podemos citar: o alto potencial de deslocamento (lixiviação); a persistência no solo; a moderada solubilidade em água, com uma persistência variada dependendo das condições físicas e químicas deste meio; uma adsorção moderada à matéria orgânica presente no solo, com potencial de fixação aos solos e sedimentos, além do potencial de alcance do lençol freático (Moura et al., 2008).

A maior causa do declínio de anfíbios parece ser a perda de habitat, mas vários outros motivos têm sido propostos, dentre esses: predadores, parasitas, doenças, radiação UV e pesticidas (Kiesecker et al., 2001). Sabe-se que o uso excessivo de herbicidas tem sido destacado como um dos fatores responsáveis por afetar diretamente o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência de populações de anfíbios no mundo (Blaustein e Johnson, 2003). Dentre os herbicidas utilizados no Brasil, neste trabalho focamos no Boral[®] 500 SC e no Glifosato[®] por serem amplamente utilizados em lavouras nas regiões de planície e planalto do Rio Grande do Sul, onde são encontrados animais não-alvo desses xenobióticos.

O herbicida sulfentrazone (2',4'-dichloro-5-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl) é utilizado em plantações (por exemplo, soja) e plantas ornamentais (USEPA, 2009), por esse ser um herbicida de amplo espectro controlando folhas largas e gramíneas (Vidal, 2002). A meia-vida do sulfentrazone em solo, de acordo com Hatzios (1998), varia de 110 a 280 dias, dependendo do tipo de solo e das condições ambientais. A rota primária para a dissipação deste herbicida em solo é por degradação microbiana (Hatzios, 1998). Passos et al. (2013) relataram que solos com pouca argila e matéria orgânica aumentam a probabilidade de contaminação futura por sulfentrazone em lavouras. Há poucos estudos sobre os efeitos de sulfentrazone em espécies aquáticas não-alvo. A agência de proteção ao meio ambiente dos Estados Unidos, USEPA, registrou e realizou estudos do sulfentrazone que indicaram que plantas aquáticas vasculares não-alvo são bastante suscetíveis ao sulfentrazone, seguido por fitoplâncton, invertebrados aquáticos e peixes (USEPA, 2009) e Hayes (2006) relatou que herbicidas

como o Boral[®] 500 SC, em estágios larvais de anfíbios podem levar a desregulação endócrina.

Já o herbicida Glifosato[®] tem como princípio ativo o glifosato, que é utilizado principalmente, em plantações de café, cana-de-açúcar, algodão, arroz, milho e soja. O glifosato (isopropilamida de N (fosfometil) glicina) é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Quanto à absorção, é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes) e translucado, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos. Com relação à sua solubilidade em água, o glifosato é altamente solúvel, apresentando valor de 11.600ppm a 25°C (Kollman e Segawa, 1995), não persistente no ambiente, sem potencial de bioacumulação e com potencial para adsorção no solo. O glifosato possui meia-vida entre 7 e 70 dias em água (Ferrees e Sarcinelli 2009; Giesy et al., 2000). As formulações comerciais do glifosato utilizam o surfactante polioxietilenoamino (POEA) para aumentar a eficácia dos ingredientes ativos e promotores de penetração na cutícula da planta (Brausch e Smith, 2007; Jiraungkoorskul et al., 2002). Contudo, é importante salientar que o surfactante POEA é mais tóxico que o próprio glifosato (Brausch et al., 2007; Giesy et al., 2000; Perkins, 2000).

Carey et al. (2001) apontam que há lacunas nas informações sobre o espaço-temporal das concentrações de contaminantes que os anfíbios são expostos, das ações sinérgicas de vários químicos e das respostas fisiológicas de anfíbios à essa exposição. Estudos têm mostrado que herbicidas podem causar mudanças em parâmetro bioquímicos e funcionais em muitos anfíbios (Solomon et al., 2008; Van Der Kraak et al., 2014; Mesléard et al., 2016; Rissoli et al., 2016). Pesticidas em anfíbios em estágios larvais podem causar um incremento da mortalidade, inclusive em diferentes concentrações de glifosato (Relyea, 2005).

Efeitos letais e subletais de herbicidas baseados em glifosato têm sido demonstrados em campo e laboratório quando os animais são expostos a concentrações da ordem de ppm (Howe et al., 2004, Comstock et al., 2007, Relyea e Jones, 2009). Em sapos (*Lithobates sylvaticus*), dados da expressão de genes (nível de RNAm) sugerem que herbicidas baseados em glifosato tem o potencial de alterar vias hormonais durante o

desenvolvimento dos girinos (Lancôt et al., 2013). Em girinos, concentrações subletais de glifosato alteraram drasticamente as respostas anti-predação desses animais, com potencial consequência negativa para a população (Moore et al., 2015). A toxicidade do glifosato em anfíbios tem sido o principal foco de pesquisas recentes que sugerem que há um sensível aumento dessa, quando comparadas com outros vertebrados, devido à sua história de vida e dependência de ambos ambientes, terrestre e aquático (Annett et al., 2014).

O estresse oxidativo vem sendo reportado como atuante em uma parte importante da toxicidade de vários xenobióticos, inclusive os herbicidas que podem conduzir a alterações de DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (Yin et al., 2014; Dornelles e Oliveira, 2014; Zanette et al., 2015). Níveis ambientais de inseticida quinalpos podem causar dano oxidativo e perda da capacidade antioxidante em peixes (*Cyprinus carpio*). Isso pode reforçar o uso deste parâmetro, assim como aqueles ligados as defesas anti-oxidantes, como biomarcadores para avaliação da contaminação por pesticidas (Hemalatha et al., 2015).

O aumento dos níveis de lipoperoxidação (LPO) é uma das maiores contribuições da perda de função celular durante o estado de estresse oxidativo e tem sido empregado como um biomarcador para estresse oxidativo in vivo e in vitro em diferentes modelos experimentais (Hermes-Lima et al., 1995; Hermes-Lima, 2004; Nunes et al., 2015). Em embriões de zebrafish foi demonstrado que os químicos arsênico e atrazina são potencialmente teratogênicos e genotóxicos, podendo levar a estresse oxidativo, sendo esses efeitos potencializados pela interação tóxica entre os dois contaminantes (Adeyemi et al., 2015).

Dornelles e Oliveira (2014) mostraram que nas brânquias, fígado e músculo de girinos de rã-touro as reservas energéticas foram severamente depletadas depois de expostos à três diferentes herbicidas Facet® (princípio ativo quinclorac), Roundup® (princípio ativo glifosato) e Primoleo® (princípio ativo atrazina), além de conduzirem a um incremento da lipoperoxidação. A glicose ocupa uma posição central no metabolismo dos animais. Quando a demanda de energia aumenta, a glicose é liberada e utilizada para produzir ATP (Nelson e Cox, 2014). Hormônios como a CORT possuem

papéis metabólicos na regulação da glicose (Wright et al., 2003). Segundo Van der Oost et al. (2003) a glicose estaria possivelmente envolvida com a sensibilidade a poluentes.

O grande potencial agroindustrial do Rio Grande do Sul, com cultivo de diversas frutas, além de extensas áreas de plantação de grãos como soja e arroz, cria a necessidade de ampliar o número de marcadores bioquímicos e funcionais frente ao uso de tóxicos como Boral[®] SC 500 e Glifosato[®], amplamente utilizados nas lavouras. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da mistura dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] sobre a composição bioquímica e o balanço oxidativo no fígado e no músculo caudal; os níveis de proteínas, glicose, triglicerídeos, ácido úrico e corticosterona plasmáticos e parâmetros de condição nutricional em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*).

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção dos animais

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 60 girinos da espécie *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802), provenientes do ranário Ranasul (Imbé, RS, Brasil, 29°56'57.5"S, 50°07'52.0"W). Todos os girinos tinham cerca de 3 meses de vida, no estágio pró-metamórfico, com ausência de membros (Coltro, 2015). Os animais foram transportados em saco plástico aerado até o Laboratório de Fisiologia Comparada, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde houve a medição e a pesagem dos indivíduos. Todos os procedimentos seguiram o Guia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (2015) e os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade (Protocolos nº 15/00471 e CEUA/PUCRS), que segue as leis reguladoras brasileiras.

Durante o período experimental sessenta girinos foram colocados em cubas de 5 litros para aclimação com água decolorada, aeração constante, temperatura de 23±1°C, fotoperíodo controlado (12h claro:12h escuro), alimentados com ração comercial (com 38% de proteínas) em quantia de 3% da massa corporal total em cada cuba. Neste estudo utilizamos uma densidade de 0,5 indivíduos por litro de água do aquário ou um animal para cerca de 2 litros de água.

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados duas vezes ao dia, a cada três dias, durante todo o período experimental de 14 dias. Os parâmetros foram os níveis de amônia, o pH, o potencial de oxirredução, a condutividade e os níveis de oxigênio dissolvido na água (SANXIN Modelo SX751).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, contendo: 12 animais no controle (C_{14}); 13 animais no Boral[®] 550 SC (B); 13 animais no Glifosato[®] (G) e 16 animais no Boral[®] 550 SC mais Glifosato[®] (BG), sendo 2 a 3 animais em cada aquário. O período de aclimação foi de 7 dias para todos os grupos experimentais e, no oitavo dia após o início do cultivo, os herbicidas foram adicionados aos grupos B, G e BG.

Os herbicidas usados neste estudo foram formulações comerciais de sulfentrazone (Boral[®] 500 SC, 500g de sulfentrazone/Kg, BASF) e glifosato (Glifosato[®], 480 g de glifosato/L, Biocarb); nas concentrações de 130 μ g/L de Boral[®] 500 SC no grupo B, de 234 μ g/L de Glifosato[®] no grupo G e, de 130 μ g/L de Boral[®] mais 234 μ g/L de Glifosato[®] no grupo BG. Foram preparadas uma solução mãe de cada herbicida (50mg/L de Boral e 48 mg/L de glifosato), através da dissolução destes em água destilada, sendo adicionada uma alíquota destes a cada uma das cubas para obtermos a concentração desejada. A exposição crônica aos herbicidas foi realizada em um sistema estático por 7 dias (168 h). As concentrações escolhidas foram baseadas em valores encontrados na água considerada potável para o consumo humano, para o sulfentrazone (USEPA, 2003) e para o glifosato dentro da faixa de concentração encontrada em ambiente natural (Marchezan et al., 2007; Silva et al., 2009).

2.2. Coleta para determinações bioquímicas

Após o período experimental foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca, com seringa heparinizada. Os girinos foram atordoados em banho de gelo, pesados, medidos, sendo então eutanasiados por decapitação. Foram removidos o fígado, o intestino (somente para determinar os parâmetros de condição nutricional), e o músculo caudal. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

2.3 Determinação dos Fatores de Condição Nutricional

Os cálculos do fator de condição nutricional para os indivíduos (K) seguiu o fator de Condição de Fulton que é obtido pela equação $K=W/L^b$ (onde $b=3$), assumindo que a relação da massa com o comprimento corporal segue uma relação isométrica. Nós assumimos que este fator é válido visto que *R. catesbeiana* exibe um crescimento em massa e comprimento proporcional nesta fase que antecede o ingresso na metamorfose. Para os órgãos os fatores de condição específicos ($K_{\text{fígado}}$ e $K_{\text{intestino}}$) e o índice hepatossomático (IHS), foram feitos seguindo Somarakis et al. (2004) e Nunes et al. (2011), sendo:

$$K = (\text{peso total/comprimento total}^3) \cdot 1000$$

$$K_{\text{fígado}} = (\text{peso do fígado/comprimento total}^3) \cdot 1000$$

$$K_{\text{intestinal}} = (\text{peso do intestino/comprimento total}^3) \cdot 1000$$

$$\text{ISH}(\%) = (\text{peso do fígado/peso total}) \cdot 100$$

2.4 Marcadores Metabólicos

As determinações experimentais no plasma dos espécimes foram feitas em duplicata, através de métodos espectrofotométricos sendo estes expressos em mg do metabólito. dL de plasma⁻¹. Os triglicerídeos foram quantificados através de kit comercial de triglicérides da Biotécnica (Triglicérides – Ref. 10.010.00), onde a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol que é convertido, pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Após, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorção em 505nm. A intensidade de cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos da amostra. Já o VLDL foi quantificado por uma relação matemática a partir dos resultados obtidos para os triglicerídeos. Os níveis de proteínas totais foram determinados utilizando-se Kit Biotécnica (Proteína Total – Ref. 10.009.00), tendo como princípio a reação de íons cobre (Cu^{+2}) com as ligações peptídicas das proteínas séricas, em um meio de reação alcalino (Reagente de Biureto), formando um líquido de coloração púrpura, com

absorbância máxima em 545nm. Os níveis de ácido úrico foram quantificados com auxílio de kit comercial de Ácido Úrico-PP da Biotécnica (Ref. 10.001.00), que tem por princípio a oxidação do ácido úrico pela uricase (UOD) em alantoína, CO₂ e H₂O₂, a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à quantidade de ácido úrico na amostra. Os níveis de glicose foram quantificados através do método da glicose oxidase com emprego do Kit Biotécnica (Glicose – Ref. 10.008.00), onde a glicose oxidase catalisa a reação da glicose formando peróxido de hidrogênio que reage com o 4-aminoantipirina a fenol, sob ação de uma peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinona vermelha. A intensidade de coloração formada é proporcional à concentração de glicose na amostra, com absorbância a 500nm.

Os níveis de corticosterona foram quantificados através do método de enzima-imuno-ensaio (ELISA) com emprego do kit da Enzo Life Science (ADI-900-097), com limite de detecção de 4 pg/mL e extensão de ensaio de 160–100.000 pg/mL, sendo detectados em 405nm de absorbância, tal kit pode ser utilizado para a quantificação de corticosterona no plasma de diferentes espécies de vertebrados, desde peixes até aves conforme material do fabricante. O uso do kit foi padronizado em nosso laboratório em plasma de girinos de rã-touro (Coltro, 2015). Os resultados foram expressos em pg/mL de plasma após logaritimização dos resultados a partir de uma curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas do hormônio (de 160pg/mL até 100.000pg/mL).

O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,9%, sendo este calculado entre as duplicatas obtidas com o ensaio padrão e parte das amostras (21 amostras). Todo o mensuramento hormonal foi realizado no mesmo dia e com o mesmo kit de ensaio.

2.5. Marcadores do Balanço Oxidativo

O fígado e músculo foram excisados e pesados; para cada grama de tecido foi acrescido de 6 ml de uma solução contendo tampão fosfato (20mm³) acrescido de cloreto de potássio (20mm³) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 1mm³ (inibidor de proteases). O tecido foi homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK) à temperatura de 4°C e centrifugado, em centrífuga refrigerada por 10

minutos a 3000rpm, nesta mesma temperatura. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado, alíquotado e congelado em freezer a -20°C para as dosagens posteriores (Llesuy, *et al.*, 1985). A concentração de proteínas no sobrenadante do homogeneizado tecidual foi determinada conforme método descrito acima.

A técnica utilizada para a quantificação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mm³, pH 10) e adrenalina (1mm³) (Boveris *et al.*, 1983).

A enzima Catalase (CAT) é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila (Webster e Nunn, 1988). A atividade da Catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima Catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio (Morgan-Martins, 2003). Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio a 50mm³ e pH 7,4, e peróxido de hidrogênio 0,3M. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955µL do tampão fosfato e 10µL de amostra do tecido, essa cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35µL do peróxido de hidrogênio para o tecido e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (µmoles de H₂O₂) por min, no comprimento de onda de 240nm. (Boveris e Chance, 1973).

A atividade da Glutathione S-transferase (GPx) foi medida de acordo com o método descrito por Boyland e Chasseaud (Boyland e Chasseaud, 1969) pela medida da

conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH) a atividade é medida com o aumento nos valores da absorbância lida a 340 nm. A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig e Jakoby, 1981a; Habig e Jakoby, 1981b). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático foi realizado por de 2,5 minutos em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mm³, EDTA 1 mm³, pH 7,0 contendo 1 mm³ GSH e 1 mm³ de CDNB; onde a absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. Como agente iniciador da reação usou-se 50ul da amostra. A atividade da enzima é expressa como mm³ol de conjugado CNDB. min⁻¹.mg proteínas¹.

A Lipoperoxidação (LPO) foi determinada por meio do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é bastante utilizada para medir o dano dos lipídios de membrana, porque o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testada na presença de ácido tiobarbitúrico, que forma um meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25ml de água destilada, 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25ml do homogeneizado. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitou-se os tubos, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados, e acrescentou-se 1,5ml de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador por 45 segundos e centrifugados por dez minutos a 3000rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em µmoles/mg de proteína (Lima e Abdalla, 2001).

2.6. *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de distribuição pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov; como todos os parâmetros determinados seguiram uma distribuição não paramétrica usou-se o Teste Kruskal-Wallis, seguido do Teste complementar de Student-Newman-Keuls para compararmos todos os grupos expostos com o grupo controle (C_{14}). Todos os testes foram realizados no programa Bioestat, versão 5.0, considerando como significativo um $p < 0,05$.

3. **Resultados e Discussão**

Em relação aos parâmetros de qualidade da água observou-se que os níveis de amônia permaneceram estáveis e abaixo de valores tóxicos (0,5); o pH foi mantido entre 7,1 e 7,3; o potencial de oxirredução; a condutividade e os níveis de oxigênio dissolvido na água (SANXIN Modelo SX751) se mantiveram dentro das conformidades (Tabela 1).

Observou-se que a taxa de sobrevivência foi de 91,7%, havendo uma mortalidade de 8,3%, sendo de 4,98% (3 animais) no grupo C_{14} e 1,66% (1 animal) tanto no grupo B quanto no grupo G, o que denota uma boa qualidade do cultivo e do uso de concentrações sub letais de herbicida. Salienta-se que os animais foram expostos a concentrações baixas destes herbicidas sendo estas subletais. Dornelles e Oliveira (2014) trabalhando com uma faixa de concentração de Glifosato da ordem de 65 até 144 $\mu\text{g/L}$, neste mesmo modelo experimental e com tamanho corpóreo semelhante (2-4 g de massa e 80-100 mm de comprimento corporal) observou uma ausência de mortalidade entre os animais; o que aliado aos nossos resultados reforça que as concentrações empregadas dos herbicidas (Boral[®] 500 SC e Glifosato[®]) foram subletais. De acordo com Vieira (1993), Costa et al. (2008), Cunha e Delariva (2009) e Dornelles e Oliveira (2016) essa resposta pode estar ligada a características da rã-touro, a qual possui alta capacidade adaptativa e plasticidade fisiológica.

3.1. *Fatores de Condição Nutricional*

Ao compararmos os valores da massa corporal obtidos para os animais observamos que o grupo B (Boral[®] 500 SC) apresentou um ganho de 12% de massa; o grupo G (Glifosato[®]) apresentou 43% de ganho ($p=0,035$) e o grupo BG (Boral[®] 500 SC

mais Glifosato[®]) apresentou 44% a mais de massa ($p=0,051$), todos em comparação com o grupo C_{14} , conforme (Tabela 2). Com relação ao comprimento corporal total dos animais observamos que o grupo B apresenta um valor médio muito semelhante ao grupo C_{14} , tendo crescido apenas 0,4% em relação a este grupo (C_{14}); já os grupos expostos ao G e ao BG aumentaram 6,9% e 7,3%, respectivamente, em relação ao grupo C_{14} , salientamos que tais diferenças não foram significativas ($p= 0,087$) (Tabela 2).

Níveis do Índice K não tiveram diferenças entre os grupos experimentais estudados ($p=0,025$) (Fig. 3A), assim como o Índice $K_{\text{hepático}}$ ($p=0,856$) (Fig. 3B). Embora os níveis do Índice $K_{\text{intestinal}}$ não tenham apresentado diferenças entre os animais expostos e o controle (C_{14}) observa-se uma diferença entre os animais expostos ao Boral[®] 500 SC e o Glifosato[®] ($p=0,004$), onde no grupo G verificamos um incremento deste índice da ordem de 1,37 vezes; no grupo onde os herbicidas foram misturados o aumento em relação ao grupo B ($p=0,001$) foi de 1,44 vezes (Fig. 3C).

Este conjunto de resultados representado pelo incremento da massa corporal aliado ao aumento do $K_{\text{intestinal}}$ sugere uma maior atividade alimentar destes animais expostos aos herbicidas, tanto isolados como em mistura; indicando que este momento parece ser crítico à sobrevivência dos animais e refletindo possivelmente, uma alteração no balanço e incremento do gasto energético para uma metabolização adequada dos herbicidas, principalmente na situação de exposição à mistura dos herbicidas (Boral[®] 500 SC + Glifosato[®]). Esta hipótese é reforçada pelos resultados encontrados por Dornelles e Oliveira (2014 e 2016) que verificaram uma redução drástica de todas as reservas energéticas (proteínas, lipídios, triglicerídeos e glicogênio) nas brânquias, fígado, rins e músculo de girinos de rã-touro submetidos a diferentes concentrações de três herbicidas (atrazina, glifosato e quinclorac). Confirmando também, o que o trabalho de Coltro (2015) observou quando submeteu girinos de rã-touro a diferentes concentrações de quinclorac.

Isto demonstra, possivelmente, um aumento na atividade hepática devido à alocação de nutrientes do trato digestório e/ou aporte de substrato de outros tecidos para este órgão, com a finalidade de manter o potencial de detoxificação destes herbicidas e à sobrevivência dos animais (91,7%); visto que não verificamos diferenças significativas para o Índice Hepatosomático (IHS) quando comparamos tanto os animais do grupo C_{14} com os expostos como entre os grupos expostos ($p=0,4727$), conforme a Fig. 3D.

É sabido que variações na quantidade de gordura e/ou glicogênio estocados no fígado influenciam significativamente na massa deste órgão, alterando assim a relação hepatossomática; outros fatores como alimentação e infecções também podem ser responsáveis por eventuais alterações em tais características biométricas em peixes teleósteos, por exemplo, (Tavares-Dias et al., 2000; Nunes et al., 2011; 2015). Além disto, de acordo com Păunescu e Ponopal (2011) adultos da rã *Pelophylax ridibundus*, quando expostos a $0,138 \times 10^{-3}$ ml de Roundup[®]/g de massa corporal, administrado por via intraperitoneal, conduziu a um ligeiro aumento no HSI dos animais indicando que as células do fígado foram afetadas causando possivelmente, um aumento na taxa de produção de retículo endoplasmático para a síntese de proteínas no tecido hepático; por conseguinte, na presença de fatores de estresse, estas qualidades são alteradas resultando e um efeito deletério sobre o fígado das rãs. Em nosso estudo as concentrações de herbicidas utilizados não conduzem a um incremento da IHS permitindo aos animais a sua metabolização sem que ocorra um dano hepático; experimentos futuros visando esclarecer tais peculiaridades se fazem necessários.

3.2. Marcadores Metabólicos

Os níveis plasmáticos de TGL e VLDL no grupo C apresentaram diferença em relação ao grupo B, G e BG (Fig. 4A e B). Observou-se que os níveis plasmáticos de TGL e VLDL no grupo B aumentaram 1,5 vezes, no grupo G aumentaram 1.4 vezes e no grupo BG aumentaram 1,5 vezes em comparação com o grupo C₁₄. Este aumento da série lipídica nos animais expostos (B, G e BG) parece relacionar-se com o incremento do $K_{\text{intestinal}}$ que pode refletir um incremento da ingesta alimentar como também, reforça resultados previamente publicados pelo nosso grupo que mostram em girinos de rã-touro expostos a uma faixa de concentração (36, 72 e 144 $\mu\text{g/L}$) de glifosato uma intensa diminuição dos níveis de lipídios totais e triglicerídeos nas brânquias, fígado e músculo caudal. Resultados similares de diminuição dos níveis de lipídios totais e/ou triglicerídeos também têm sido verificados por outros autores para o músculo e/ou fígado de animais expostos a xenobióticos (El-Banna et al., 2009; Salbego et al., 2010; Sounderraj et al., 2011).

Os níveis de proteínas totais não apresentaram diferença ($p=0,307$) entre os grupos experimentais (Fig. 2C). Contudo, para os níveis de ácido úrico verificamos um

incremento de 2,7; 2 e 9,5 vezes nos grupos Boral® 500 SC, Glifosato® e na mistura de Boral® 500 SC mais Glifosato®, respectivamente. Assim, acreditamos que a exposição a estas concentrações de sulfentrazone (130µg/L), de glifosato (234µg/L), como da mistura destes herbicidas induz um aumento na produção de ácido úrico para que esta molécula ou seus derivados atuem como antioxidante não enzimático. Diferente do verificado neste estudo, Coltro et al. (2017) mostraram uma relação dependente negativa entre os níveis de ácido úrico plasmático e a concentração do herbicida Facet® (princípio ativo: quinclorac) ao qual girinos de rã-touro foram expostos sugerindo, também, o uso desta molécula como antioxidante.

Cabe ressaltar que em anfíbios o ácido úrico é considerado um produto intermediário, onde o principal produto da excreta nitrogenada é a ureia (Nelson e Cox, 2014). De acordo com Zanette et al. (2015), na craca *Balanus improvisus* o ácido úrico parece atuar como um antioxidante natural; e Hermes-Lima (2004) também demonstra um papel antioxidante de derivados desta molécula (uratos) em insetos sugadores de sangue. Em aves, propriedades antioxidantes do ácido úrico aliada a altas concentrações plasmática sugerem um possível mecanismo de proteção a danos oxidativos (Tsahar et al., 2006).

Os níveis plasmáticos de glicose não apresentaram diferenças significativas ($p=0,39$) nem entre o C_{14} e nem entre os expostos (Fig. 4E). Coltro et al. (2017) também verificaram uma manutenção dos níveis de glicose circulantes em girino de rã-touro exposta a diferentes concentrações do herbicida quinclorac, existindo uma diferença somente entre as concentrações do herbicida. Dornelles e Oliveira (2016) trabalhando com rã-touro exposta a diferentes concentrações de glifosato mostram uma intensa diminuição dos níveis de glicogênio em diferentes órgãos, como o fígado o que talvez possa explicar a manutenção da glicemia aqui observada. Este polissacarídeo desempenha um papel central no equilíbrio energético de diferentes vertebrados, pois é capaz de fornecer energia rápida em situações de estresse (Moyes e Schulte, 2010), como aquelas provocadas por pesticidas (Barton e Iwama, 1991); a glicose resultante da glicogenólise pode também, ser utilizada na síntese de glicoproteínas, constituintes essenciais da célula; processo este fundamental em situações de estresse (Vutukuru, 2005).

Para a corticosterona (CORT) verificamos uma diferença entre o grupo G em relação ao grupo C14 ($p=0,0323$), tendo este diminuído 2,1 vezes nos animais expostos. Quando comparamos os grupos expostos entre si verificamos que o grupo do Boral[®] 500 SC difere tanto do grupo do Glifosato[®] (grupo G) ($p=0,0005$) como do grupo da mistura (grupo BG) ($p=0,0010$), observou-se que o grupo B apresentou níveis 1,85 e 1,66 vezes maiores, respectivamente (Fig. 4F). A ação dos glicocorticóides, como a corticosterona, mostra-se essencial em diversos em diferentes vertebrados apresentando efeitos metabólicos e endócrinos como: estimular a gliconeogênese, inibir a captação de glicose por tecidos periféricos, suprimir a secreção de insulina, causando a mobilização da energia estocada e seu redirecionamento ao tecido muscular, prover energia durante o crescimento e a diferenciação dos órgãos, como também em situações de estresse (Costantini et al., 2011). Em anfíbios este hormônio tem um papel chave na regulação da metamorfose, induzindo este processo (Wright et al., 2003); o que nos permite sugerir que a diminuição dos níveis de corticosterona nos girinos expostos ao glifosato e a mistura de sulfentrazone e glifosato pode levar a um retardo na entrada da metamorfose em função do uso de compostos energéticos para garantir a detoxificação destes herbicidas e assim, a sobrevivência dos animais. Níveis altos e constantes de corticosterona circulantes podem conduzir a um efeito de *feed-back* negativo diminuindo assim, a responsividade deste eixo e a secreção de corticosterona, podendo alterar inclusive o funcionamento dos receptores celulares de glicocorticóides (Costantini et al., 2011 e Costantini, 2014). Não podemos descartar a ocorrência deste mecanismo nos animais expostos ao glifosato isolado como também a mistura de sulfentrazone e glifosato face à diminuição dos níveis deste hormônio nestes grupos. O que em uma escala temporal maior pode tornar estes girinos menos responsivos a situações sinérgicas de estresse, como por exemplo, fragmentação de habitat, radiação UV, outros poluentes, agentes patogênicos, espécies invasores, entre outros; conduzir a declínio da população de anfíbios.

De acordo com Lima et al. (2006) em animais aquáticos, as respostas ao estresse são um mecanismo adaptativo que permite a sobrevivência na presença de estressores pela manutenção da homeostase. Essas respostas podem ocorrer em nível tecidual, o que inclui a mobilização de substratos energéticos. Dependendo da intensidade do

estressor, os animais podem ser incapazes de consequentes alterações e apresentam reações tais como a inibição do crescimento, da reprodução ou da resposta imune.

3.3. Marcadores do Balanço oxidativo

No fígado os níveis de atividade da Superóxido Dismutase (SOD) observa-se apenas uma diferença significativa do grupo BG (mistura) em relação ao grupo controle (C_{14}), com um decréscimo nos níveis da atividade da SOD em 1,7 vezes. Verifica-se também, que o grupo BG apresentou uma diferença em relação ao grupo B ($p < 0,0001$) e ao grupo G ($p = 0,001$); sendo estes níveis 2,3 e 1,6 vezes maiores, respectivamente no grupo B e no grupo G do que aqueles do grupo BG (Fig. 5A). Perfil semelhante foi observado para a atividade da Catalase (CAT), onde a mistura de herbicidas (BG) leva a uma diminuição da atividade desta enzima em relação ao controle (C_{14}) ($p = 0,052$) e aos herbicidas isolados (B: $p = 0,0005$ e G: $p = 0,044$). No grupo B estes níveis foram 2,27 vezes e no grupo G, 1,64 vezes maiores que aqueles do BG (Fig. 5B). Já para os níveis de Glutathione S-transferase (GST) observa-se uma diferença do grupo C14 em relação aos grupos B ($p = 0,014$) e G ($p = 0,010$), onde os níveis do grupo B aumentaram 2,01 vezes e do grupo G aumentaram 1,78 vezes. Observou-se também que os níveis do grupo B foram 1,85 e os do grupo G 1,63 vezes maiores em relação ao grupo BG, apresentando este grupo (BG) valores muito próximos daqueles observados no grupo controle (C14) (Fig. 5C). Os níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) apresentaram diferenças significativas somente quando comparamos os grupos B e G ($p = 0,0002$) e, os grupos G e BG ($p = 0,0009$). Os níveis de TBARS no grupo B foram maiores em 3,05 vezes e no grupo BG 2,3 vezes que aqueles verificados no grupo G (Fig. 5D).

No fígado a mistura de Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] conduz a uma drástica diminuição de Glutathione S-transferase assim, novamente, podemos sugerir que a mistura parece ser mais agressiva aos girinos quando comparada aos resultados obtidos com os herbicidas isolados. Cabe ressaltar que nos animais do grupo BG observamos altos níveis de ácido úrico circulantes sugerindo a participação do sistema antioxidante não enzimático neste processo de detoxificação. Coltro et al. (2017) descrevem uma capacidade constitutiva enzimática elevada em girinos de *Rana castesbeiana*. Jones et al. (2010) sugerem que incrementos na atividade destas enzimas podem ser causados

pelo aumento da transcrição dos genes responsáveis pela codificação de proteínas específicas; como também, por uma alta capacidade antioxidante enzimática constitutiva o que impediria o dano oxidativo.

Nos grupos expostos ao Boral[®] e ao Glifosato[®] isolados a manutenção da atividade da Superóxido Dismutase e da Catalase, aliado a um incremento da Glutathione S-transferase parecem ser determinantes para impedirem um aumento dos níveis de Lipoperoxidação no grupo B e diminuí-los no grupo G. A exposição à xenobióticos pode ser associada ao incremento da expressão ou atividade de enzimas de biotransformação, como por exemplo, as Glutathione S-transferases (Hermes-Lima e Storey, 1993). A biotransformação de componentes orgânicos pode ser em linhas gerais categorizada em duas fases principais: a epoxidação/hidroxilação dessas moléculas (reações de fase I) e a conjugação de xenobióticos com componentes endógenos como a Glutathione (GSH) (reações de fase II) catalisada pela GST (Nunes et al., 2015). Já nos animais expostos à mistura dos herbicidas observamos um perfil diferente com uma diminuição da SOD e manutenção dos demais parâmetros oxidativos analisados (CAT, GST e TBARS). Segundo Banerjee et al. (1999) o aumento da atividade da GST parece ser o mecanismo adaptativo mais utilizado para conter situações de estresse oxidativo em animais. Seria possível sugerir que a mistura destes herbicidas possa ser mais lesiva que o sulfentrazone e o glifosato isolados para estes animais e nestas concentrações. Os efeitos do glifosato em organismos aquáticos foram abordados em peixes por Cattaneo (2011), Rossi et al. (2011). Modesto & Martínez (2010a) mostraram que este herbicida aumenta a atividade de GST hepático e outras enzimas envolvidas na defesa antioxidante no peixe *Prochilodus lineatus*.

Os níveis de atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no tecido muscular não apresentaram diferença entre os grupos experimentais estudados ($p=0,6077$) (Figura 6A); perfil semelhante, também foi observado para a atividade da Catalase (CAT) neste mesmo tecido ($p=0,1816$) (Fig. 6B). Já para os níveis de Glutathione S-transferase (GST) verificamos que os animais submetidos à mistura de herbicidas (BG) apresentam uma redução em relação a todos os grupos experimentais (C14 com $p<0,0001$; B com $p<0,0001$ e G com $p=0,0007$). Esta redução atingiu valores 14,5; 12,3 e 10,49 vezes menores nos grupos C14; B e G, respectivamente (Fig. 6C). Os níveis de Substâncias

Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no tecido muscular apresentou diferença entre o grupo BG em relação ao grupo C14 ($p < 0,0001$), assim como ao grupo B ($p = 0,0004$) e ao grupo G ($p < 0,0001$). Verificamos uma diminuição de 2,56 vezes do grupo BG em relação ao grupo B. Já para o grupo B os níveis apresentaram um aumento de 3,55 vezes em relação ao grupo G (Fig. 6D).

No músculo caudal a mistura de Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] conduz a uma drástica diminuição de Glutathione S-transferase assim, novamente, podemos sugerir que a mistura parece ser mais agressiva aos girinos quando comparada aos resultados obtidos com os herbicidas isolados. Cabe ressaltar que nos animais do grupo BG observamos altos níveis de ácido úrico circulantes sugerindo a participação do sistema antioxidante não enzimático neste processo de detoxificação. Coltro et al. (2017) descrevem uma capacidade constitutiva enzimática elevada em girinos de *Rana castesbeiana*. Jones et al. (2010) sugerem que incrementos na atividade destas enzimas podem ser causados pelo aumento da transcrição dos genes responsáveis pela codificação de proteínas específicas; como também, por uma alta capacidade antioxidante enzimática constitutiva o que impediria o dano oxidativo.

No melhor dos nossos conhecimentos, este estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos adversos da mistura dos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] em girinos anfíbios. Boral[®] 500 SC e Glifosato[®] são herbicidas amplamente utilizados em campos de soja e espécimes da ordem Anura são geralmente encontrados nessas áreas. Os resultados apresentados aqui indicam que os efeitos causados pelos herbicidas Boral[®] 500 SC e Glifosato[®], impactam no sistema antioxidante destes animais. O estudo sobre a mistura de pesticidas obteve os benefícios desejados na conservação, incluindo a conservação de espécies nativas.

4. Conclusões

Embora várias pesquisas tenham sido desenvolvidas sobre a exposição de anfíbios a herbicidas contendo glifosato, estas investigações têm-se centrado no efeito de comportamento, deformidades morfológicas e alterações nos estágios de desenvolvimento; poucas são as pesquisas analisando marcadores bioquímicos nestes animais. No entanto, alguns trabalhos sobre alterações bioquímicas dos anfíbios

expostos a herbicidas contendo glifosato foram realizados por autores como Coltro (2015), Dornelles (2013), Dornelles e Oliveira (2016, 2014), Navarro-Martín et al. (2014), Rissoli et al. (2016). Não foi possível encontrar pesquisas envolvendo o herbicida sulfentrazone em anfíbios e nem a mistura destes herbicidas. No entanto, é importante ressaltar que as respostas encontradas podem diferir dependendo da espécie, da concentração e duração da exposição ao contaminante. Faz-se necessário que sejam realizados mais estudos para investigar os efeitos potenciais do risco ecotoxicológico de herbicidas e suas misturas em concentrações realísticas em nas populações de anfíbios coletados em ambiente natural e não só mantidos em cultivo laboratorial.

Mesmo em baixas concentrações, semelhantes àquelas encontradas em ambiente natural, estes herbicidas induziram alterações nos parâmetros analisados, principalmente no fator de condição específico ($K_{\text{intestinal}}$); nos níveis de triglicérides, de ácido úrico e de corticosterona plasmáticos; e na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e primordialmente a GST modulando os níveis de peroxidação lipídica no fígado e músculo caudal. Estas alterações parecem estar ligadas a um incremento da demanda energética na tentativa de manter a homeostase e garantir a sobrevivência dos animais; diminuindo assim, a energia disponível para o crescimento e a metamorfose o que pode comprometer o ciclo de vida adulto. Podemos sugerir que a mistura de sulfentrazone e glifosato parece ser mais lesiva aos animais, principalmente pela manutenção e diminuição drástica dos níveis de atividade da Glutathione S-transferase no fígado e no músculo caudal, respectivamente.

Um maior número de programas de monitoramento contínuo, uso de biomarcadores e exposição com análises químicas da água poderiam identificar os agrotóxicos presentes nessa mistura e relacioná-los aos efeitos observados em animais e assim auxiliar na conservação.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Zoologia pela PUCRS pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de uma Bolsa de Mestrado ao primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) pela concessão de uma Bolsa de Produtividade em Pesquisa (nível 2) ao autor correspondente (processo nº 307071 / 2015-4).

6. Referências

- Adeyemi, J.A., da Cunha Martins-Junior, A., Barbosa, F., 2015. Teratogenicity, genotoxicity e oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic e atrazine. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxic Pharmacol*, 172, 7-12.
- Annett, R., Habibi, H. R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol*, 34(5), 458-479.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 107:33-47
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3-26.
- Belló-Klein, A., 2002. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: Marroni NP (ed) *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Ed. Ulbra, Canoas, pp 15-19
- Blaustein, A.R., Johnson, P.T.J., 2003. The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.* 1, 87-94.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar. Biol.* 146(1), 53-64.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 34:707-717
- Boveris, A., Fraga, C.G., Varsaysky, A.I., Koch, O.R., 1983. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227:534-541
- Boyland, E., Chasseaud, L.F., 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 32: 173-219
- Brausch, M.J., Beall, B., Smith, N.P., 2007. Acute e sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78(6):510-4.
- Brausch, M.J., Smith, N.P., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory e field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 217-221.
- Carey, C., Heyer, W.R., Wilkinson, J., Alford, R.A., Arntzen, J.W., Halliday, T., Hungerford, L., Lips, K.R., Middleton, E.M., Orchard, S.A., Rand, A. S., 2001.

Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates. *Conserv. Biol.* 15(4), 903-913.

Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., Menezes, C.C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., Avila, L.A., 2011. Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing Glyphosate. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 87: 597-602.

Coltro, M.D.L., 2015. A influência do herbicida FACET® (Quinclorac) nos níveis de corticosterona, metabólitos plasmáticos e nas defesas antioxidantes do fígado de girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) (Master's thesis, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

Coltro, M.L., da Silva, P.R., Valgas, A.A.N., Miguel, C.M., Freitas, B.S., Oliveira, G.T., 2017. Influence of the herbicide quinclorac (Facet®) on corticosterone levels, plasma metabolites, and antioxidant balance in liver and muscle tissues of tadpoles of *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. Submitted: *Water, Air & Soil Poll.*

Comstock, B.A., Sprinkle, S.L., Smith, G.R. 2007. Acute toxic effects of Round-up herbicide on wood frog tadpoles (*Ranasylvatica*). *J. Freshwater Ecol.* 22:705-7.

Costa, M.J., Monteiro, D.A., Oliveira-Neto, A.L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers e heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicol.* 17(3):153-63.

Costantini, D., 2014. Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology: a Marriage between Mechanistic and Evolutionary Approaches. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag.

Costantini, D., Marasco, V., Møller, A.P., 2011. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J. Comp. Physiol. [B]*, 181(4), 447-456.

Cunha, E.R., Delariva, R.L., 2009. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): uma revisão. *SaBios-Rev. Saúde Biol.* 4.2.

Dornelles, M.F., 2013. Efeito dos herbicidas Atrazina, Glifosato e Quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Dissertação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil.

Dornelles, M.F., Oliveira, G.T., 2014. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation e survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66:415-429

Dornelles, M.F., Oliveira, G.T., 2016. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(2), 1610-1620.

El-Banna, S.G., Attia, A.M., Hafez, A.A., El-Kazaz, S.A., 2009. Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/ antioxidant parameters in rat males exposed to chlorpyrifos. *Slovak J. Anim. Sci.* 42, 111-117.

- Fernandes Neto, M.D.L., Sarcinelli, P.D.N., 2009. Pesticides in drinking water: a risk assessment approach and contribution to the Brazilian legislation updating process. *Eng. Sanit. Amb.* 14(1), 69-78.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167:35-120.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981a. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77:218-31.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981b. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 77:398-405.
- Hatzios, K. K., 1998. Supplement to herbicide handbook. Weed Science Society of America, Lawrence, 67-69.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, e amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114:40–50
- Hemalatha, D., Amala, A., Rangasamy, B., Nataraj, B., Ramesh, M., 2015. Sublethal toxicity of quinalphos on oxidative stress e antioxidant responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol.* 31, 1399-1406.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology e biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation e Adaptation*. John Wiley & Sons, New Jersey, 1, 319-368.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. In vitro oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. *Mol. Cell. Biochem.* 124(2), 149-158.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19-271-280.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbring, C.C., Werry, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:1928-1938
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a Glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia.* 28:121-127.
- Jones, L., Gossett, D.R., Banks, S.W., McCallum, M.L., 2010. Antioxidant defense system in tadpoles of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) exposed to paraquat. *J. Herpetol.* 44(2), 222-228.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Belden, L.K., 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature.* 410, 681–684.
- Kollman, W., Segawa, R., 1995. Interim report of the pesticide chemistry database 1995. Environmental Hazards Assessment Program. EH95-04. State of California,

Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring and Pest Management Branch

Lanctôt, C., Robertson, C., Navarro-Martín, L., Edge, C., Melvin, S.D., Houlihan, J., Trudeau, V.L., 2013. Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax® on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. *Aquat. Toxicol.* 140, 48-57.

Lima LC, Ribeiro LP, Leite RC, 2006. Estresse em peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 30:113–117

Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz. J. Pharm. Sci.* 37(3), 293-303.

Llesuy, S.F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., Milei, S., 1985. Comparison of lipid peroxidation e myocardial damage induced by adriamycin e 4' epiadriamycin in mice. *Tumori.* 71(3), 241-249.

Marchezan, E., Zanella, R., Avila, L.A., 2007. Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Sci. Agric.* 64:131–137

Mesléard F., Gauthier-Clerc, M., Lambret, P., 2016. Impact of the insecticide Alphacypermetrine e herbicide Oxadiazon, used singly or in combination, on the most abundant frog in French rice fields, *Pelophylax perezi*. *Aquat. Toxicol.* 176, 24-29.

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010a. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78: 294-299.

Moore, H.; Chivers, D.P.; Ferrari, M.C.O., 2015. Sub-lethal effects of Roundup™ on tadpole anti-predator responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 281-285.

Morgan-Martins, M. I. (2003). A Reposição de Estrogênio Diminui o Dano Oxidativo, Aumenta a Atividade das Enzimas Antioxidantes e Melhora a Função Cardíaca em Ratas. Doutorado (Ciências Biológicas – ênfase em Fisiologia). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre.

Moura, M.A.M., Franco, D.A.S., Matallo, M.B., 2008. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. *Rev. Tecnol. Inov. Agropec.* 142-151.

Moyes, C.D., Schulte, P.M., 2010. Princípios de Fisiologia Animal. Artmed, Porto Alegre.

Mudiam, M.K.R., Pathak, S.P., Gopal, K., Murthy, R.C., 2012. Studies on urban drinking water quality in a tropical zone. *Environ. Monit. Assess.* 184: 461-469.

Navarro-Martín, L., Lanctôt, C., Jackman, P., Park, B.J., Doe, K., Pauli, B.D., Trudeau, V.L. (2014). Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquat. Toxicol.* 154, 278-290.

Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. Princípios de Bioquímica: Lehninger. Artmed, Porto Alegre.

- Nunes, B.S., Travasso, R., Gonçalves, F., Castro, B.B., 2015. Biochemical and physiological modifications in tissues of *Sardina pilchardus*: spatial and temporal patterns as a baseline for biomonitoring studies. *Front. Environ. Sci.* 3: 1-14
- Nunes, C., Silva, A., Soares, E., Ganiás, K., 2011. The use of hepatic e somatic indices e histological information to characterize the reproductive dynamics of Atlantic sardine *Sardina pilchardus* from the Portuguese coast. *Mar. Coast. Fish* 3, 127-144.
- Passos, A.B.R., Freitas, M.A.M., Torres, L.G., Silva, A.A., Queiroz, M. E.L., Lima, C.F., 2013. Sorption and desorption of sulfentrazone in Brazilian soils. *J. Environ. Sci. Health [B]*. 48(8), 646-650.
- Păunescu, A., Ponepal, C.M., 2011. Effect of Roundup® herbicide on physiological indices in marsh frog *Pelophylax ridibundus*. *Scientific Papers, Bucharest*, 54: 269-274
- Perkins, P.J., Boermans, H.J., Stephenson, G.R., 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay- *Xenopus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 940– 945.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15:2, 618-627.
- Relyea, R.A., Jones, D.K., 2009. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(9).
- Rissoli, R.Z., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Rantin, F.T., McKenzie, D.J., Kalinin, A.L., 2016. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 156, 37-44.
- Rossi, S.C., Silva, M.D., Piancini, L.D., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2011. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87: 603-607.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58:3, 740-5.
- Silva, M.D., Peralba, M.C.R., Mattos, M.L.T., 2003. Determinação de Glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas. Ver. Ecotoxicol. Meio Amb.* 13:19-28
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38(9):721-72. .
- Sounderraj, S.F.L., Sekhar, P., Kumar, P.S., Lesley, N., 2011. Effect of systemic pesticide phosphamidon on haematological aspects of common frog *Rana tigrina*. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 2:6, 1776-1780.

Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Moraes, F.R., 2000. Relação hepatossomática e esplenosomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. Rev. Bras. Zool. 17 (1): 273-281.

Tsahar, E., Arad, Z., Izhaki, I., Guglielmo, C. G. (2006). The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin: a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds. J. Comp. Phys. [B], 176(7), 653-661.

USEPA - US Environmental Protection Agency 2009. Sulfentrazone registration review. EPA-HQ-OPP-2009-0624. Washington, DC.

Van Der Kraak, G.J., Hosmer, A.J., Hanson, M.L., Kloas, W., Solomon, K.R., 2014. Effects of atrazine in fish, amphibians, e reptiles: An analysis based on quantitative weight of evidence. Crit. Rev. Toxicol. 44:1-66.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharm. 13(2), 57-149.

Vidal, R.A. 2002. Ação dos herbicidas. Porto Alegre. 89p

Vieira, M.I., 1993. Rã touro gigante: características e reprodução. Infotec, São Paulo.

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

Webster, N.R., Nunn, J.F., 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. Br. J. Anaesth. 60(1), 98-108.

Wright, M.L., Guertin, C.J., Duffy, J.L., Szatkowski, M.C., Visconti, R.F., Alves, C.D., 2003. Developmental and diel profiles of plasma corticosteroids in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Comp. Bioch. Phys. [A]. 135(4), 585-595.

Yin, X., Jiang, S., Yu, J., Zhu, G., Wu, H., Mao, C., 2014. Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, e lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. Environ. Toxicol. Pharm. 37(3):1229-35.

Zanette, J., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2015. Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvises*: pollution and seasonal effects. Mar. Environ. Res. 103:74-79.

Tabela 1. Valores médios do potencial de oxirredução (ORP), condutividade e oxigênio dissolvido ao longo do cultivo experimental.

Grupo	ORP (mV)	Condutividade (mS)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)
C₇	193.666±2.60	308.000±11.84	6.220±0.01
C₁₄	207.000±2.23	323.710±18.56	6.591±2.12
B	201.055±2.39	318.555±9.936	6.525±2.28
G	193.388±2.57	322.611±10.96	6.597±2.17
BG	187.178±2.32	279.746±14.79	6.680±1.71

Tabela 2. Resultados obtidos para a massa corporal e comprimento dos animais. Média dos valores aos quatorze dias de permanência no laboratório (C₁₄) e expostos (B, G e BG).

Grupos	Massa (gramas)	Comprimento (mm)
C₁₄	2,3640±0,2092	70,8922±2,1060
B	2,6588±0,1815	71,1708±1,5974
G	3,3828±0,3647	75,7745±2,2447
BG	3,4268±0,2280	76,0864±1,6051

Figura 1. Gráfico resumo (*graphical abstract*) do artigo.

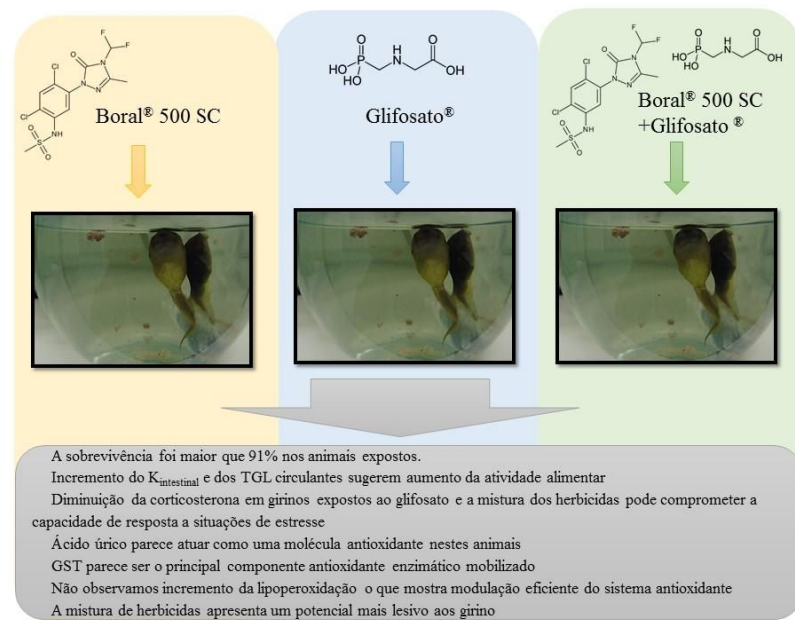


Figura 2. Curva padrão de corticosterona obtida no ensaio hormonal.

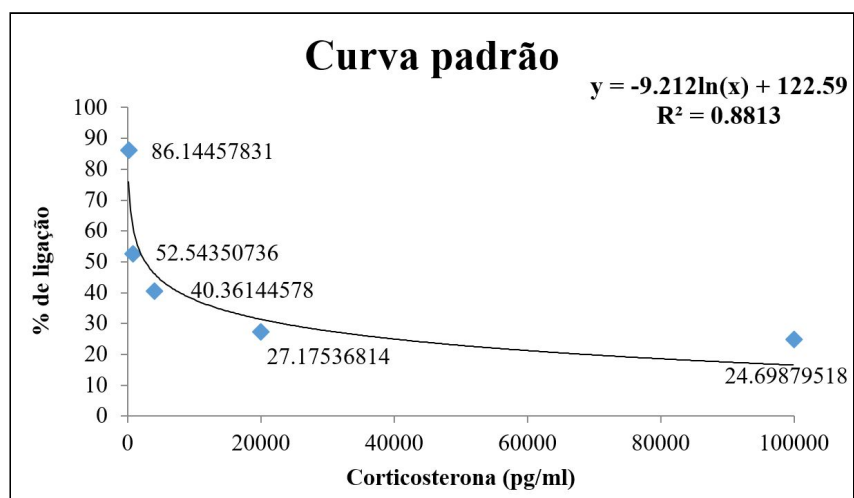


Figura 3. Variações nos Fatores de Condição Nutricional e Índice Hepatosomático, sendo (A) Níveis de K, (B) $k_{\text{hepático}}$, (C) $k_{\text{intestinal}}$ e (D) Índice Hepatosomático obtidos para girinos de *Rana catesbeiana* divididos em controle (grupo C₁₄), expostos ao Boral® 500 SC (grupo B), expostos ao Glifosato® (grupo G) e expostos à mistura destes herbicidas (grupo BG). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão.

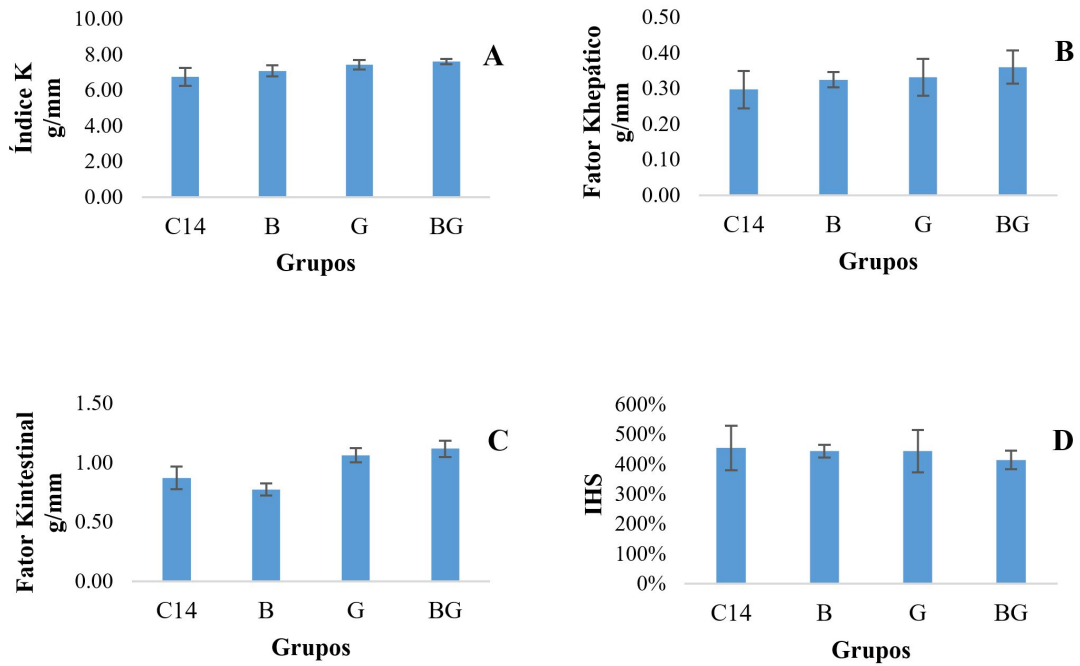


Figura 4. Variações nos níveis plasmáticos de (A) TGL, (B) VLDL, (C) Proteínas totais, (D) Ácido Úrico, (E) Glicose e (F) Corticosterona em girinos de *Rana catesbeiana* divididos em controle (grupo C₁₄), expostos ao Boral[®] 500 SC (grupo B), expostos ao Glifosato[®] (grupo G) e expostos à mistura destes herbicidas (grupo BG). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão.

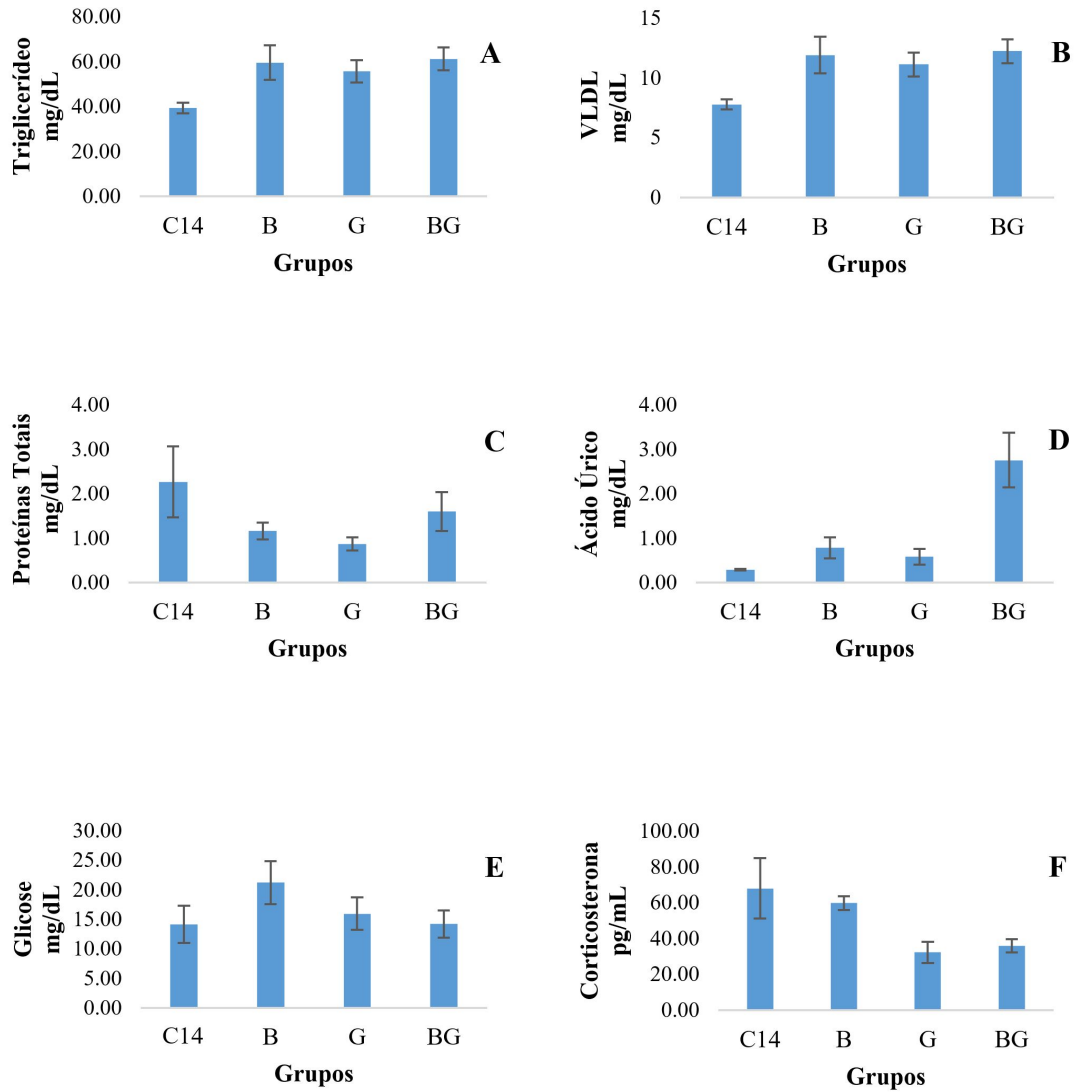


Figura 5. Variações nos níveis de (A) Superóxido Dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Glutathione S-Transferase (GST) e (D) TBARS do fígado em girinos de *Rana catesbeiana* divididos em controle (grupo C₁₄), expostos ao Boral® 500 SC (grupo B), expostos ao Glifosato® (grupo G) e expostos à mistura destes herbicidas (grupo BG). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão.

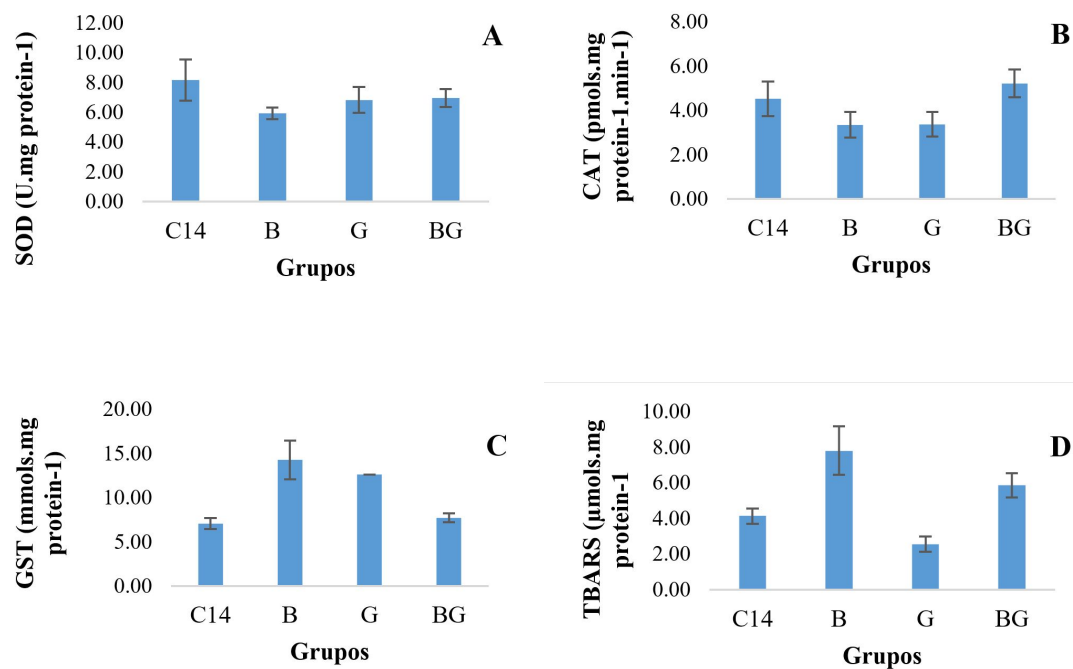
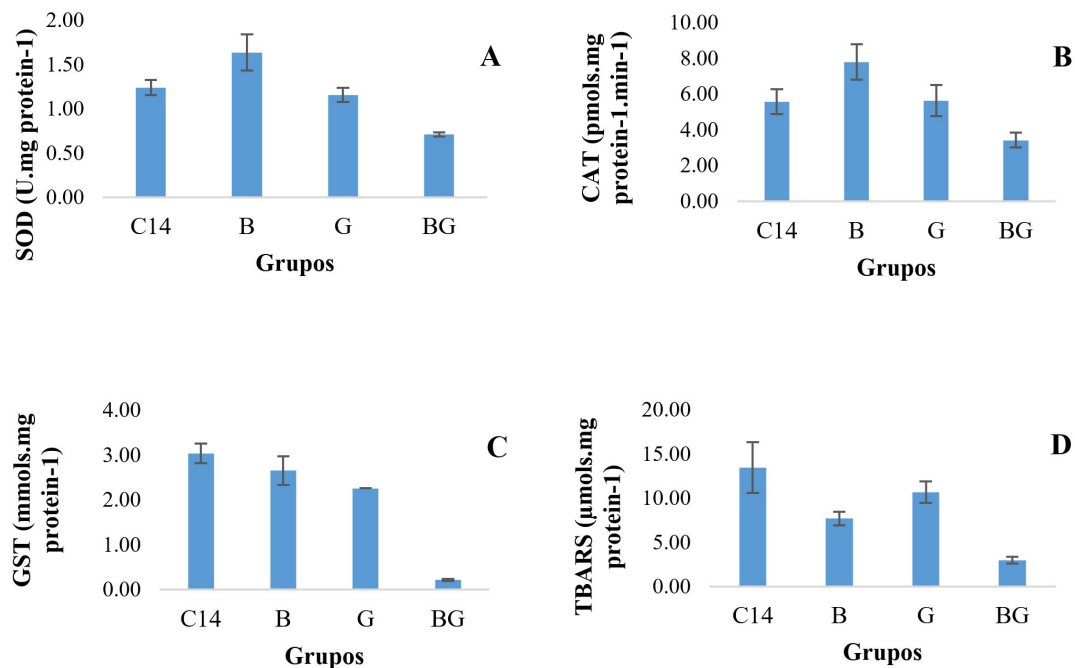


Figura. 6. Variações nos níveis de (A) Superóxido Dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Glutathione S-Transferase (GST) e (D) TBARS do músculo caudal em girinos de *Rana catesbeiana* divididos em controle (grupo C₁₄), expostos ao Boral[®] 500 SC (grupo B), expostos ao Glifosato[®] (grupo G) e expostos à mistura destes herbicidas (grupo BG). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão.



Capítulo 2

Conclusão geral que elucida acerca de todo o projeto realizado, com considerações envolvendo os resultados obtidos e o Anexo I que apresenta as normas de padrão de elaboração do artigo para a submissão à revista escolhida.

Conclusões Gerais

Com o presente trabalho conclui-se que concentrações dos herbicidas Boral® 500 SC e Glifosato® comumente encontradas em corpos d'água naturais, podem ocasionar alterações nos parâmetros bioquímicos como nos níveis de triglicerídeos, proteínas totais, além de induzir a peroxidação lipídica em girinos de *Rana catesbeiana*, Shaw 1802; apesar de não termos observado uma mortalidade significativa, nem tampouco alterações no ganho de massa corporal ou comprimento corpóreo destes animais.

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

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

Anexo I



TOXICOLOGY

Affiliated with the [German Toxicology Society](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0300-483X

DESCRIPTION

Toxicology, an international journal, publishes only the highest quality original research and critical reviews dealing with the adverse effects of **xenobiotics** on the **health** of humans and animals. The goal of the journal is to advance the scientific understanding of **mechanisms** of **toxicity**. Emphasis will be placed on toxic effects observed at relevant exposures, which have direct impact on **safety evaluation** and **risk assessment**. All manuscripts published in *Toxicology* are subject to rigorous peer review. In addition to original research articles, concise and current review and mini-review articles are also welcome, as are personal opinion papers and commentaries. Please consult the [Managing Editors](#) for special instructions prior to [submitting](#) such articles.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Toxicologists, Pharmacologists, Epidemiologists, Teratologists.

IMPACT FACTOR

2015: 3.817 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents/Life Sciences
MEDLINE®
EMBASE
Environmental Mutagen Information Center
PASCAL/CNRS
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Managing Editors

H.W.J. Marquardt, Department of Toxicology, Hamburg University Medical School, Kortenredder 3, 22397 Hamburg, Germany, Fax: +49 40 60558553

K.B. Wallace, Biochemistry and Molecular Biology, University of Minnesota at Duluth, 255 School of Medicine, 1035 University Drive, Duluth, MN 55812, USA, Fax: +1 218 726 8014

Honorary Editors

H.P. Witschi, Inst. of Toxicology and Environmental Health (ITEH), University of California, Davis, Old Davis Road, Building 3792, Room 129, Davis, California, CA 95616-8615, USA, Fax: +1 530 752 5300

K.J. Netter, Dept. of Pharmacology & Toxicology, School of Medicine, Philipps-Universität Marburg, Karl-von-Frisch-Strasse 1, D-35033, Marburg, Germany, Fax: +49 6421 2865600

Editorial Board

M. Arand, Zurich, Switzerland

H. Barth, Ulm, Germany

G. Begum, Hyderabad, India

G. Brambilla, Genova, Italy

R.J. Bull, Richland, Washington, USA

G.P. Carlson, West Lafayette, Indiana, USA

I. Çelik, Van, Turkey

J.E. Chambers, Mississippi State, Mississippi, USA

M.-C. Chang, Taoyuan, Taiwan, ROC

J.K. Chipman, Birmingham, England, UK

M.-H. Cho, Seoul, South Korea

S.M. Cohen, Omaha, Nebraska, USA

J.C. Corton, Research Triangle Park, North Carolina, USA

D.A. Cory-Slechta, Rochester, New York, USA

E.E. Creppy, Bordeaux Cedex, France

G. Daston, Cincinnati, Ohio, USA

J. Descotes, Lyon, France

J.L. Domingo, Reus, Catalonia, Spain

J. Doull, Kansas City, Kansas, USA

J. Edwards, Adelaide, South Australia, Australia

P.E. Ganey, East Lansing, Michigan, USA

N.J. Gooderham, London, England, UK

J.I. Goodman, East Lansing, Michigan, USA

M. Göttlicher, Neuherberg, Germany

G.M. Hawksworth, Aberdeen, UK

J. He, Hangzhou, China

J.G. Hengstler, Dortmund, Germany

R.A. Herbert, Research Triangle Park, North Carolina, USA

S.W. Hockertz, Seelze, Germany

M. Jokanovic, Belgrade, Serbia

R. Kahl, Düsseldorf, Germany

N.E. Kaminski, East Lansing, Michigan, USA

E.M. Kenyon, Research Triangle Park, North Carolina, USA

M. Firoze Khan, Galveston, TX, USA

J.E. Klaunig, Indianapolis, Indiana, USA

L.H. Lash, Detroit, Michigan, USA
C. Lau, Research Triangle Park, North Carolina, USA
B.P. Lawrence, Rochester, New York, USA
E.A. Lock, Liverpool, England, UK
J.E. Manautou, Storrs, Connecticut, USA
F.L. Martin, Lancaster, UK
E. Maser, Kiel, Germany
T.E. Massey, Kingston, Ontario, Canada
D.L. McCormick, Chicago, Illinois, USA
H. Mori, Gifu, Japan
A. Nemmar, Al-Ain, United Arab Emirates
G. Oberdörster, Rochester, New York, USA
S.T. Omaye, Reno, Nevada, USA
E.A. Ostrakhovitch, London, Ontario, Canada
M. Paulmichl, Salzburg, Austria
J. Pauluhn, Wuppertal, Germany
J.M. Peters, University Park, Pennsylvania, USA
S. Pillet, Laval, Quebec, Canada
C.N. Pope, Stillwater, Oklahoma, USA
A. Puga, Cincinnati, Ohio, USA
G.O. Rankin, Huntington, West Virginia, USA
E. Richter, München, Germany
K. Savolainen, Helsinki, Finland
G. Schoenfelder, Berlin, Germany
D. Schrenk, Kaiserslautern, Germany
H.-J. Schuurman, Utrecht, Netherlands
W.M. Valentine, Nashville, Tennessee, USA
C. Watanabe, Tokyo, Japan
C.C. Willhite, Novato, California, USA
D. Wölfe, Berlin, Germany
M.I. Yousef, Alexandria, Egypt

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Toxicology, an international journal, publishes only the highest quality original research and critical reviews dealing with the adverse effects of xenobiotics on the health of humans and animals. The goal of the journal is to advance the scientific understanding of mechanisms of toxicity. Emphasis will be placed on toxic effects observed at relevant exposures, which have direct impact on safety evaluation and risk assessment. All manuscripts published in *Toxicology* are subject to rigorous peer review.

Types of paper

In addition to original research articles, concise and current review and mini-review articles are also welcome, as are personal opinion papers and commentaries. Please consult the Managing Editors for special instructions prior to submitting such articles.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Conflict of interest

Toxicology follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#). See also: <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public

access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

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

Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. When submitting the revised manuscript, it is a requirement to submit two versions:

Revised Manuscript without tracked changes: The manuscript should be a single word processing file containing the title page, abstract, manuscript text, and any figure/table legends.

Revised Manuscript with tracked changes: This file should be the same as the revised manuscript but it should also display the tracked changes. Switch on 'track changes' in your word processor to display any revisions that were made.

Minimal exceptions will be exercised.

Referees

The Editors welcome suggestions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors, reserve the right to use these or other reviewers.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscripts should be typewritten double spaced.

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide 3 to maximum 6 keywords that include the full chemical name(s). Use British spelling and avoid general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M.

(2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

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

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

RESEARCH DATA

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>