

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE  
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CRISTIANO ROBERTO HENTGES

**IMPACTO DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO  
SOBRE GIRINOS DE *Boana faber* EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE LABORATÓRIO**

Porto Alegre  
27 de maio de 2023

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**IMPACTO DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE HERBICIDA À BASE DE  
GLIFOSATO SOBRE GIRINOS DE *Boana faber* EXPOSTOS EM CONDIÇÕES  
CONTROLADAS DE LABORATÓRIO**

por

Cristiano Roberto Hentges

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em  
biologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Guendalina Turcato  
Oliveira

Porto Alegre (RS), 27 de maio de 2023

*Aos autores que me inspiraram a chegar até aqui:  
Arthur Rimbaud, Manuel de Barros e Fernando Pessoa.  
Às pessoas que estiveram do meu lado:  
Mariana Neumann e Marina Oliveira Santos.  
E a mim, que mudei de caminho tarde, mas nunca desisti.*

*Próximo das habitações, descobri um pequeno charco, onde, pelo crepúsculo, ouvi, espantado, o notável coaxar de uma rã até então desconhecida para mim: soava exatamente como o martelo do funileiro ou do caldeireiro; apenas o som era mais profundo e cheio. Só muito depois conheci melhor esse animal que os portugueses apelidam de 'ferreiro' devido ao coaxar.*

Maximilian zu Wied-Neuwied

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, minha mãe científica, pessoa admirável, Guendalina Turcato Oliveira e todos os membros do laboratório de Fisiologia da Conservação da PUCRS, especialmente, Jonas Brum Gonzalez, Tiziane Fernandes Molina e Artur Antunes Navarro Valgas.

# IMPACTO DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE GIRINOS DE *Boana faber* EXPOSTOS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE LABORATÓRIO

Cristiano Roberto Hentges

Maio/2023

Orientadora: Guendalina Turcato Oliveira, Doutora

Área de Concentração: Ecologia

Linha de Pesquisa: Ecotoxicologia

Número de páginas: 58

## RESUMO

Atividades humanas, direta ou indiretamente, tornaram 41% das espécies de anfíbios do planeta sujeitas a alguma ameaça de extinção. Esta crise é decorrente da ação sinérgica de diversos fatores, incluindo a fragmentação e degradação dos habitats, principalmente para fins agrícolas, e a exposição a contaminantes derivados destas atividades. A natureza ectotérmica dos anfíbios e o seu modo de vida tanto na água quanto na terra os torna especialmente sujeitos a esses estresses ambientais. Avaliamos os efeitos sobre o balanço oxidativo, metabolismo e índices de condição corporal devidos a diferentes níveis de exposição a uma formulação comercial do herbicida glifosato (formulação comercial - Roundup®) na espécie popularmente conhecida como sapo-martelo (*Boana faber*), um anuro da família Hylidae que ocupa grande parte do litoral brasileiro e está presente também na quase totalidade da Mata Atlântica. Sendo assim, desovas do anuro foram coletadas e, pós a eclosão, quando os animais atingiram o estágio 25 de Gosner, foram expostos a diferentes concentrações de glifosato (G1: 65, G2: 260 e G3: 520  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) por sete dias. Não observamos mortalidade entre os animais nem durante o cultivo e nem durante a exposição ao glifosato. Realizamos a medição de marcadores do balanço oxidativo (superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase, lipoperoxidação e proteínas carboniladas), fatores de condição corporal (massa, comprimento, fator K e Kn), um antioxidante não-enzimático (ácido úrico) e marcadores metabólicos (proteínas totais e glicogênio total dos animais). Apesar de os animais apresentarem atividade da superóxido dismutase aumentada no grupo de maior exposição e manterem a atividade da catalase e glutathione S-transferase, eles não conseguiram conter os níveis de carbonilação de suas proteínas, demonstrando oxidação das mesmas e, assim, sofrendo estresse oxidativo. Além disso, os índices medidos de condição corporal também não revelaram diferenças significativas no comprimento, massa, fator K e Kn dos animais expostos. No entanto, na concentração mais alta do herbicida, todos estes índices apresentaram um valor menor que o controle exposição. Estes resultados, aliados à intensa redução dos níveis de glicogênio em todas as concentrações expostas, indicam o uso deste polissacarídeo para a sobrevivência do animal. O conjunto de biomarcadores analisados mostrou que esse herbicida pode causar alterações nas defesas antioxidantes, no metabolismo e, conseqüentemente, nos parâmetros de condição corporal de girinos, o que pode comprometer o tempo de desenvolvimento da espécie e, possivelmente, a sua aptidão.

Palavras-chave: *Boana faber*, dano oxidativo, ecotoxicologia.

# **IMPACT OF A COMMERCIAL FORMULATION OF GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON *Boana faber* TADPOLES EXPOSED UNDER CONTROLLED LABORATORY CONDITIONS**

Cristiano Roberto Hentges

Maio/2023

Advisor: Guendalina Turcato Oliveira, Doctor

Area of Concentration: Ecology

Research Line: Ecotoxicology

Number of pages: 58

## **ABSTRACT**

Human activities, directly or indirectly, have made 41% of amphibian species on the planet subject to some threat of extinction. This crisis is due to the synergistic action of several factors, including the fragmentation and degradation of habitats, mainly for agricultural purposes, and exposure to contaminants derived from these activities. The ectothermic nature of amphibians and their way of life both in water and on land make them especially subject to these environmental stresses. We evaluated the effects on oxidative balance, metabolism and body condition indices due to different levels of exposure to a commercial formulation of the herbicide glyphosate (commercial formulation - Roundup®) in the species popularly known as the blacksmith tree frog (*Boana faber*), an anuran of the family Hylidae that occupies a large part of the Brazilian coast and is also present in almost all of the Atlantic Forest. Thus, anuran spawns were collected and, after hatching, when they reached the Gosner stage 25, they were exposed to different concentrations of glyphosate (G1: 65, G2: 260 and G3: 520  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) for seven days. We did not observe mortality among the animals either during cultivation or during exposure to glyphosate. We performed the measurement of oxidative balance markers (superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase, lipoperoxidation and carbonyl proteins), body condition factors (mass, length, K and Kn factor), a non-enzymatic antioxidant (uric acid) and metabolic markers (total proteins and total animal glycogen). Although the animals showed increased superoxide dismutase activity in the higher exposure group and maintained catalase and glutathione S-transferase activity, they were unable to contain the levels of carbonylation of their proteins, demonstrating oxidation of the same and, thus, suffering oxidative stress. The measured indices of body condition did not reveal significant differences in the length, mass, K and Kn factor of the exposed animals. However, at the highest herbicide concentration, all these indices showed a value lower than the exposure control. These results, combined with the intense reduction of glycogen levels in all exposed concentrations, indicate the use of this polysaccharide for animal survival. The set of biomarkers analyzed showed that this herbicide can cause alterations in the antioxidant defenses, in the metabolism and, consequently, in the body condition parameters of tadpoles, which can compromise the development time of the species and, possibly, its fitness.

Keywords: *Boana faber*, oxidative damage, ecotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Exemplar adulto de *Boana faber* (fonte: <https://www.inaturalist.org>) \_\_\_\_\_ 8
- Figura 2** - Local da coleta no Pró-Mata, próximo a sede (fonte: Laura Kauer Schuck) \_\_\_\_\_ 12
- 
- Figura 3** – Foto da desova de *Boana faber* e dos locais de coleta (fonte: Priscila Barth e Carolina Caberlon) \_\_\_\_\_ 13
- Figura 4** - Esquema detalhando o desenho experimental e as concentrações aplicadas do herbicida (fonte: autor) \_\_\_\_\_ 16
- Figura 5** - Massa dos animais expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . 23
- Figura 6** - Comprimento dos animais expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . 24
- Figura 7** - Curva de crescimento estabelecida através da relação entre a massa corporal e o comprimento total dos animais dos grupos controle (CD e CE). \_\_\_24
- Figura 8** – Fator k (massa observada/massa esperada) dos girinos expostos a concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 25
- Figura 9** - Fator de condição alométrico ( $k_n$ ) dos animais expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 25
- Figura 10** - Níveis de tbars nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . 26
- Figura 11** - Níveis de proteínas totais do sobrenadante nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 27
- Figura 12** - Níveis de sod nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . 27

- Figura 13** - Níveis de cat nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . 28
- Figura 14** - Níveis de gst nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . 29
- Figura 15** - Níveis de proteínas carboniladas nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 29
- Figura 16** - Níveis de ácido úrico nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 30
- Figura 17** - Níveis de glicogênio nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 31
- Figura 18** - Níveis de proteínas totais nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 31

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Parâmetros abióticos da água utilizada para preenchimento dos aquários durante todo o período de experimentação. Valores médios dos meses de dezembro/2021 e janeiro/2022 do sistema geral de distribuição, mensurado pelo Dmae da cidade de Porto Alegre \_\_\_\_\_ 14
- TABELA 2** - Parâmetros abióticos monitorados diariamente nos aquários durante o cultivo experimental de *Boana faber*. \_\_\_\_\_ 15
- TABELA 3** - Valores obtidos nos grupos controle para os parâmetros analisados no cultivo de boana faber expostos ao glifosato. Período de aclimatação (12 dias) e exposição (7 dias). Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*=  $p < 0,05$ .  
Fonte: tabela elaborada pelo autor. \_\_\_\_\_ 22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	Ácido úrico
CAT	Catalase
GST	Glutathione S-transferase
GG	Glicogênio
K	Fator de condição
Kn	Fator de condição relativo
PC	Proteínas carboniladas
PT	Proteínas totais KOH
PTS	Proteínas totais do sobrenadante
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1	Objetivo geral .....	11
2.2	Objetivos específicos .....	11
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1	Determinação dos fatores de condição .....	16
3.2	Determinação do balanço redox.....	17
3.3	Marcadores do balanço oxidativo.....	17
3.4	Marcadores de metabolismo.....	19
3.5	Análise estatística .....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
4.1	Massa, comprimento e fatores de condição corporal.....	22
4.1.1	Massa.....	23
4.1.2	Comprimento .....	23
4.1.3	Fatores de condição k e kn.....	24
4.2	Marcadores de balanço oxidativo.....	26
4.2.1	Lipoperoxidação .....	26
4.2.2	Proteínas totais do sobrenadante (PTS).....	26
4.2.3	Superóxido dismutase .....	27
4.2.4	Catalase .....	28
4.2.5	Glutathiona s-transferase .....	28
4.2.6	Proteínas carboniladas .....	29
4.3	Marcadores do metabolismo.....	30
4.3.1	Ácido úrico.....	30
4.3.2	Glicogênio.....	30
4.3.3	Proteínas totais.....	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios são o segundo grupo mais ameaçado de extinção dentre todos os seres vivos. De acordo com União Internacional para a Conservação da Natureza, somente o grupo das plantas cicadófitas possuem mais espécies em risco de serem extintas. Quanto aos anfíbios, cerca de 41% das espécies conhecidas também estão sofrendo ameaças de extinção. Das 7316 espécies avaliadas pela organização, 731 encontram-se em estado vulnerável, 1103 em perigo, 681 criticamente em perigo. Outras 34 espécies já estão extintas e 2 espécies extintas na natureza (IUCN, 2022).

O Brasil é um país privilegiado quanto à riqueza de anfíbios. Das cerca de 8500 espécies descritas no mundo, 1188 são encontradas aqui, tornando-o o país com a maior biodiversidade mundial de espécies (SEGALLA, 2021). No entanto, atualmente 15 espécies já se encontram vulneráveis, 10 em perigo e 34 criticamente em perigo (ICMBio, 2023). Especialistas brasileiros concordam que a riqueza de espécies de anfíbios locais, a taxonomia, a distribuição geográfica, a história natural e o status populacional são muito pouco estudados em nosso país (PIMENTA *et al.*, 2005). Além disso, considerando aves, mamíferos e anfíbios, a avaliação global de espécies, publicada em 2004 pela IUCN, afirma que as Florestas Tropicais/Subtropicais Úmidas são de longe os biomas mais ricos em número de espécies e de espécies ameaçadas, e são os únicos biomas com um número significativo de espécies endêmicas ou de endemias ameaçadas dos três táxons. Ademais, a distribuição das espécies ameaçadas é desigual, o que significa que a maioria das espécies ameaçadas conhecidas ocorrem em poucos países, sendo a Austrália, o Brasil, a China, a Indonésia e o México os que possuem um número particularmente grande de espécies ameaçadas e endêmicas (BAILLIE *et al.*, 2004).

Tal fenômeno (o declínio de populações de anfíbios ao redor do mundo) ficou conhecido como crise de extinção dos anfíbios (*amphibian extinction crisis*) na comunidade científica, e foi reconhecido no início da década de 1990 pelo biólogo evolucionário e herpetólogo David B. Wake (1936-2021), embora desde a década de 70 já houvesse evidências de um declínio acentuado do grupo. Desde então, pesquisadores têm proposto várias hipóteses para entender a causa do problema. O corpo de evidências mais atual sustenta que é o fungo quítrido anfíbio (*Batrachochytrium dendrobatidis*) o principal causador do declínio do grupo (O'HANLON *et al.*, 2018). No entanto, outros fatores têm sido apontados como agravantes do fenômeno e, considerando que essa crise de biodiversidade tem se mostrado um problema científico complexo, é seguro afirmar que há interações sinérgicas

entre mais de um dos fatores (BLAUSTEIN *et al.*, 2010). Algumas das hipóteses recorrentes são a alteração e destruição do habitat (KNOZOWSKI, 2022), contaminação ambiental (BLAUSTEIN, 2003), introdução de espécies exóticas (KNAPP e MATTHEWS, 2000), outros tipos de doenças (DASZAK *et al.*, 1999), aumento da radiação ultravioleta B (KIESECKER e BLAUSTEIN, 1995) e as mudanças climáticas (MCMENAMIN, HADLY e WRIGHT, 2008).

A contaminação ambiental, apontada como um dos estressores principais, também se expressa no uso crescente e cada vez mais diversificado de agentes tóxicos como os agrotóxicos, por exemplo. Embora estes agentes sejam parcialmente responsáveis pela Revolução Verde que ampliou a produção de alimentos no mundo no século passado, eles também afetam indevidamente espécies que habitam áreas próximas de locais de cultivo. Um desses agentes é o Glifosato (N-(fosfonometil) glicina), um herbicida sistêmico de amplo espectro e o mais utilizado no mundo para o controle de ervas daninhas (PARLAPIANO *et al.*, 2021), mesmo tendo sido classificado em 2015 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como provavelmente cancerígena para humanos (GUYTON *et al.*). O uso de herbicidas à base de glifosato (HBGs) desde 1976, quando foram lançados, aumentou mais de 100 vezes (MYERS *et al.*, 2016), tornando-os substâncias de grande interesse de estudo no campo da ecotoxicologia. Esse fato tornou vital entender os possíveis danos causados em organismos não-alvo como, por exemplo, humanos e diversos elementos da fauna.

O glifosato é um herbicida amplamente utilizado na agricultura, silvicultura e ambientes urbanos para controlar ervas daninhas. Funciona inibindo a enzima 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase, uma enzima essencial para o crescimento da planta que é ligada à síntese de aminoácidos essenciais (tirosina, triptofano e fenilalanina), causando sua morte (KRUSE, 2000).

Esta substância tem sido objeto de debates e controvérsias nos últimos anos. Enquanto alguns estudos têm evidenciado que a exposição ao glifosato pode estar ligada ao câncer e a defeitos congênitos, o comitê conjunto da OMS e da FAO sobre resíduos de pesticidas emitiu um relatório em 2017 afirmando que o uso de formulações de glifosato não constitui necessariamente um risco à saúde (OMS/FAO, 2017). Mchenry (2018), em artigo analisando o escândalo que ficou conhecido como The Monsanto Papers, afirma que os documentos desclassificados revelam autoria patrocinada pela empresa de artigos publicados em periódicos de toxicologia e na mídia leiga, interferência no processo de revisão por pares, influência de bastidores na retratação e até mesmo a criação de um site dito acadêmico como fachada para a defesa de produtos da empresa. De qualquer forma, preocupações têm sido

levantadas sobre o impacto do glifosato no meio ambiente, particularmente em polinizadores, outros insetos benéficos e diversos outros animais (GILL *et al.*, 2018; HELANDER *et al.*, 2023).

Apesar dessas preocupações, o glifosato ainda é amplamente utilizado e considerado seguro por muitas agências reguladoras, como a Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos Estados Unidos e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). No entanto, nos últimos anos, alguns países começaram a proibir ou restringir o uso de glifosato, citando preocupações sobre seus potenciais impactos à saúde e ao meio ambiente. Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou o glifosato como um "provável carcinógeno humano" (IARC, 2018). Portanto, pesquisas e regulamentações estão em andamento atualmente para garantir maior segurança do glifosato e do seu impacto no meio ambiente e na saúde humana.

No Brasil, esse problema se repete. Os HBGs são os herbicidas mais usados no país (MORAES, 2019). No ano de 2020 foram vendidas 246.017 toneladas da substância e seus sais (IBAMA, 2021). O problema é ainda mais grave se considerarmos que em 2019 já havia mais de 110 produtos comercializados com glifosato (DOMINGUES, 2019), tornando o estudo da substância um problema urgente, embora cada vez mais difícil. Isso porque este agrotóxico é utilizado frequentemente com adjuvantes, substâncias adicionadas à formulação do produto para aumentar a sua eficácia ou modificar determinadas propriedades da solução permitindo aumentar sua atividade (VARGAS, 2006). Esses adjuvantes têm sido comumente classificados como diluentes inertes por não serem considerados responsáveis diretos pela atividade do glifosato como agrotóxico (ANNETT *et al.*, 2014). No entanto, os adjuvantes de cada formulação comercial são confidenciais mesmo para os órgãos reguladores (MESNAGE *et al.*, 2014), gerando dúvidas se de fato são inertes e dificultando a compreensão ampla do efeito da substância pelos pesquisadores. Entre eles, podemos citar o surfactante polioxietilenoamina (POEA), presente em diferentes formulações comerciais contendo glifosato, como por exemplo o Roundup Original®, que vem se mostrando tóxico e sinérgico ao glifosato em animais (MIKÓ e HETTYEY, 2023).

A natureza ectotérmica dos anfíbios, o seu modo de vida tanto na água quanto na terra, a grande proporção de espécies endêmicas presentes no grupo e a permeabilidade da pele (BOYER e GRUE, 1995) os torna especialmente sensíveis a este tipo de substâncias, refletindo em uma alta sensibilidade a vários poluentes ambientais. Há evidências de que a redução de populações de anfíbios está também correlacionada com a proximidade a terras

agrícolas devido ao escoamento de agrotóxicos, confirmando sua vulnerabilidade aos agroquímicos (ISLAM *et al.*, 2018).

Os Hylidae são uma família de anfíbios comumente conhecidos como pererecas. Eles são encontrados em todo o mundo e são conhecidos por seus hábitos arbóreos, o que significa que passam a maior parte do tempo em árvores e outras vegetações. Esta família inclui espécies como a Perereca-verde (*Aplastodiscus perviridis*) e a Perereca-do-banhado (*Boana pulchella*) e a Perereca-telefone (*Scinax tymbamirim*) (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007; KWET *et al.*, 2010).

Esses animais desempenham um papel importante em muitos ecossistemas ao redor do mundo. Eles são predadores e presas, e sua presença pode ajudar a manter as populações de insetos sob controle. Eles também fornecem alimento para muitos outros animais, incluindo pássaros, mamíferos e répteis. Além disso, seus cantos desempenham um papel fundamental na comunicação da espécie, sendo utilizados para acasalamento e defesa do território. Suas populações têm diminuído globalmente devido à perda e fragmentação do habitat, poluição e disseminação de doenças (BLAUSTEIN *et al.* 2003).

O impacto causado pelo glifosato ou suas formulações em diferentes espécies tem sido avaliado por vários autores nas últimas décadas (por exemplo, AMES *et al.*, 2022; DORNELLES e OLIVEIRA, 2013; BONFANTI, 2017; GILL *et al.*, 2018). Contudo, inexistem estudos atualmente medindo marcadores ligados ao balanço oxidativo, ao sistema de biotransformação e a fatores de condição nutricional em uma formulação contendo glifosato na espécie do estudo aqui proposto, *Boana faber*, embora os efeitos morfológicos, comportamentais e genotóxicos tenham sido mensurados anteriormente por Pavam *et al.* (2021) e, também, tenha sido estimada a LC50-(96 h) e taxa de sobrevivência em Alves-Ferreira *et al.* (2023).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que os efeitos do glifosato em girinos também podem induzir alterações nas proporções de energia e reservas estruturais, como glicogênio, lipídios totais e proteínas, bem como no balanço oxidativo, como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (COLTRO *et al.*, 2017; DORNELLES e OLIVEIRA, 2016 e 2014; GRIPP *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020; WILKENS *et al.*, 2019), levando a alterações das respostas antipredação dos girinos, com potencial consequência negativa para sua população (BROWNE e MOORE, 2014).

Segundo Ighodaro e Akinloye (2017), as moléculas antioxidantes que constituem a rede de defesa antioxidante nos seres vivos atuam em diferentes níveis. Tais níveis podem prevenir radicais, eliminá-los e/ou reparar os danos induzidos por estes. Com base em sua

função, os antioxidantes podem ser categorizados como antioxidantes de defesa de primeira linha, segunda, terceira e de quarta linha.

Os de primeira linha são uma coleção de antioxidantes que atuam para prevenir a formação de radicais livres ou espécies reativas nas células. Eles são muito rápidos em neutralizar qualquer molécula com potencial de se transformar em radical livre ou qualquer radical livre com capacidade de induzir a produção de outros radicais. Nesta categoria há três enzimas principais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas dismutam o radical superóxido, quebram peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos em moléculas inofensivas. A SOD é uma enzima que catalisa alternadamente a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio molecular comum ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esse processo de detoxificação é completado pela CAT, que catalisa a redução de  $H_2O_2$  em água e  $O_2$ , já que o  $H_2O_2$  em altas quantidades é deletério para células. A CAT é encontrada em peroxissomos, enquanto a glutathione peroxidase (GPx) faz o papel da quebra de  $H_2O_2$  nas mitocôndrias, além de peróxidos orgânicos (IGHODARO e AKINLOYE, 2017).

Ainda segundo os mesmos autores, os antioxidantes de segunda linha são muitas vezes referidos como antioxidantes de limpeza. Eles eliminam os radicais ativos a fim de inibir o início de reações em cadeia e, também, quebram reações que se propagam em cadeia. Eles neutralizam ou eliminam os radicais livres doando elétrons para eles e, no processo, tornando-se eles próprios radicais livres, mas com efeitos menos prejudiciais. Esses “novos radicais” são então facilmente neutralizados e tornados inofensivos por outros antioxidantes desse grupo. Nesta categoria de antioxidantes estão ácido ascórbico, vitamina E, ubiquinol, glutathione, melatonina e ácido úrico (COSTANTINI, 2014). A última substância foi medida neste trabalho.

O ácido úrico, além de atuar como antioxidante, é um marcador de degradação de proteínas, seja do trato digestório, seja dos tecidos. Trata-se de um composto orgânico eficaz por ser um doador de elétrons em processos de desintoxicação xenobiótica (GLANTZOUNIS *et al.*, 2005). Assim como a glicose, o ácido úrico está diretamente relacionado ao metabolismo em anfíbios, sendo um dos produtos intermediários da excreção de nitrogênio após o catabolismo de proteínas e purinas (TAKADA e NOGUCHI, 1983), embora não seja a principal forma de excreção de nitrogênio da classe Anura. Essa resposta parece ocorrer devido ao uso das reservas de proteína corporal como uma resposta compensatória ao estressor ou, talvez, como fonte de um agente antioxidante não enzimático (COLTRO *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2020).

A peroxidação lipídica, ou oxidação da camada lipídica da membrana celular, é um mecanismo importante para medir lesões celulares. Esse processo é um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade de agrotóxicos que vem sendo utilizado nos últimos anos como um marcador desta interação, já que lipídios são facilmente oxidados por espécies reativas. Pesquisadores encontraram evidências de aumento de lipoperoxidação como efeito da exposição a Roundup® em girinos de *Lithobates catesbeianus*, o que é hipotetizado pelos mesmos como consequência da diminuição das enzimas SOD e CAT no músculo esquelético e, graças a isso, um acúmulo de EROs (CAMPOS *et al.*, 2008). Animais expostos a pesticidas podem ter seus níveis de peroxidação lipídica aumentado nos tecidos, levando a danos químicos e morte celular (AL-OTHMAN *et al.*, 2011; CHAMPE e HARVEY, 2006).

Tal dano aos lipídios das células e da membrana celular são medidos através do ensaio que mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essas substâncias são um subproduto da peroxidação lipídica, consistindo em uma cascata de reações oxidativas resultantes da ação de EROs sobre os fosfolipídios das membranas celulares (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006). A intensidade da peroxidação lipídica pode ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários ou ainda através dos produtos finais da peroxidação como, por exemplo, o malondialdeído (MDA) que é ensaiado com o ácido tiobarbitúrico e expresso em TBARS (LUSHCHAK e BAGNYUKOVA, 2006), (ORUÇ e USTA, 2007).

As proteínas carboniladas resultantes da oxidação causada diretamente por EROs ou por produtos de oxidação lipídica são observadas em maior quantidade durante o envelhecimento e doenças como diabetes e doença de Parkinson (NARAYANASAMY *et al.*; 2014). Derivados de carbonila podem ser gerados pela oxidação de resíduos de aminoácidos, por isso a medição dos seus níveis é um método adequado de aferição de dano protéico (STADTMAN, 1990), já que o surgimento de grupos carbonil em proteínas é considerado evidência de modificação oxidativa (LEVINE, 1994).

A GST atua na biotransformação através da conjugação de xenobióticos à glutathiona reduzida. É uma isoenzima metabólica mais conhecida por sua capacidade de catalisar a conjugação da forma reduzida de glutathiona (GSH) a substratos xenobióticos para fins de biotransformação, transformando-os em produtos hidrossolúveis, facilmente metabolizáveis e excretáveis. Além disto, algumas GSTs atuam de forma semelhante à GPx, sendo capazes de conjugarem hidroperóxidos orgânicos com a glutathiona oxidada e álcoois (COSTANTINI, 2014). Por atuar nesses tipos de reações, a GST tem sido utilizada como biomarcador de exposição a agrotóxicos (MINGO *et al.*, 2017). Pesquisadores têm relatado que a atividade da GST diminui sob efeito de herbicidas que contém glifosato em sua formulação (GÜNGÖRDÜ

*et al.*, 2016). Contudo, esta resposta pode variar conforme a espécie e o tecido estudado (WILKENS *et al.*, 2019).

O glicogênio é um polissacarídeo multiramificado de glicose que serve como uma forma de armazenamento de energia em animais, fungos e bactérias. É a principal forma de armazenamento de glicose no corpo humano. Além disso, Ezemonye e Tongo (2009) sustentam que herbicidas como o glifosato, atrazina e quinclorac podem ter efeitos em parâmetros bioquímicos e fisiológicos nos níveis de estoques de energia e compostos estruturais (como glicogênio, lipídios e proteínas); enquanto Dornelles e Oliveira (2014 e 2015) demonstram que os parâmetros de balanço oxidativo em girinos de rã-touro também são afetados.

A interação da atrazina nos organismos está frequentemente associada à depleção do armazenamento de glicogênio, o que é uma evidência da diminuição da estocagem de energia (CICIK e ENGIN, 2005). A depleção do conteúdo de glicogênio em organismos expostos à atrazina, comparados ao grupo controle, é um indicativo de provável efeito toxicológico observado, além de representar, possivelmente, um aumento do gasto energético para compensar o estresse causado pelo herbicida, como proposto por Da Silva *et al.* (2020) para girinos expostos a sulfentrazone e glifosato. A redução nos níveis de glicogênio de girinos expostos à atrazina pode ser o resultado do pesticida afetando as atividades de enzimas que atuam na glicogenólise (CRAVEN *et al.*, 2021). Algumas investigações também mostraram que contaminantes orgânicos, como pesticidas, podem diminuir o nível de glicogênio de invertebrados e peixes, afetando as atividades de enzimas que desempenham um papel ativo no metabolismo de carboidratos (CICIK e ENGIN, 2005). A perda de glicogênio pode ser considerada como uma resposta inespecífica que significa estresse, e que tem sido associada a alterações no cortisol durante exposições de estresse tóxico em vertebrados (WEDEMEYER, BARTON e MCLEAY, 1990).

As proteínas totais podem estar diminuídas em condições estressantes e consequente aumento do gasto energético após exposição a agrotóxicos. Isso pode ocorrer devido a uma tentativa de biotransformar compostos tóxicos para aumentar a síntese de ATP ou para a formação de lipoproteínas (GANESHWADE, 2012).

Tendo estes fatos em consideração, a espécie selecionada para esse projeto foi *Boana faber* (sapo-martelo), pertencente à família Hylidae (FIG. 1).



**Figura 1** - Exemplar adulto de *Boana faber* (Fonte: <https://www.inaturalist.org>)

Trata-se de uma espécie descrita em 1821 pelo naturalista Maximilian zu Wied-Neuwiede. O seu estado de conservação de acordo com a IUCN é de menor preocupação e é uma das maiores do gênero, medindo entre 8.5 e 10 cm (LUZA *et al.*, 2015). Sua distribuição vai do leste do Paraguai e norte do Rio Grande do Sul até o extremo nordeste brasileiro, ocorrendo em grandes porções dos biomas da Mata Atlântica e do Cerrado (MARTINS e HADDAD, 1988). Vive em florestas tropicais úmidas e nas bordas dessas florestas, mas também é encontrada próxima à áreas agrícolas, permitindo contato com agrotóxicos. Reproduz-se fazendo ninhos em corpos d'água temporários ou permanentes (incluindo corpos d'água artificiais) e perto de riachos de fluxo lento (LAVILLA *et al.*, 2010). Tais fatores estão relacionados à biologia e ao ciclo de vida desses animais, já que habitam ambientes aquáticos e terrestres e se alimentam de plantas e animais que podem ser importantes rotas de captura de poluentes (WELLS, 1977). Por fim, outro fator que reforçou o interesse no estudo dos efeitos de agrotóxicos em anfíbios é que muitas das espécies que põem ovos na água ou em espuma possuem uma membrana fina e permeável em seus ovos, assim como uma pele permeável quando adultos (BOONE e BRIDGES, 2003; SCHIESARI *et al.*, 2007).

É preciso considerar, adicionalmente, que os anfíbios são bons bioindicadores de poluição ambiental devido à sua suscetibilidade a produtos químicos durante seu ciclo de vida em água doce (VENTURINO *et al.*, 2003). Além disso, as fases iniciais da vida de muitas espécies são restritas ao ambiente aquático (BOYER e GRUE, 1995).

O termo bioindicador aqui será usado na acepção de Gerhardt, ou seja, trata-se de uma espécie ou grupo de espécies que prontamente reflete o estado abiótico ou biótico de um ambiente, representa o impacto da mudança ambiental em um habitat, comunidade ou

ecossistema ou é indicativo da diversidade de um subconjunto de taxa ou toda a diversidade dentro de uma área (2011). Mais especificamente, também de acordo com Gerhardt, utilizaremos uma categoria mais específica de bioindicador que são os indicadores ambientais: É uma espécie ou grupo de espécies que respondem previsivelmente a distúrbios ou mudanças ambientais. De acordo com Siddig, ao revisar 1914 artigos que utilizaram esta técnica de conservação entre 2001 e 2014, o uso de bioindicador como indicador ecológico para monitorar mudanças ambientais é confiável e econômico. Além disso, o mesmo autor conclui que desse número de artigos, somente 1% utilizou anfíbios como bioindicadores (2016).

Para Gerhardt, existem vários critérios necessários para que uma espécie seja considerada um bom bioindicador. É necessária alta abundância e ampla distribuição em um determinado tipo de ambiente, fácil amostragem, classificação e armazenamento. Adicionalmente, fácil taxonomia e reconhecimento, pelo não especialista, baixo custo de manutenção e facilmente cultivável em laboratório. Importante é que não sejam nem muito sensíveis, nem muito resistente. Que tenhamos bons conhecimentos sobre a ecologia, fisiologia e distribuição das espécies e, por fim, que a resposta do bioindicador deve ser representativa das respostas de outros táxons ou mesmo do ecossistema. Dentre todos esses critérios, somente o conhecimento sobre a ecologia e fisiologia são inadequados. Afora isso, consideramos a espécie uma candidata apropriada como bioindicadora.

O município escolhido para a coleta de massas de ovos de *Boana faber* foi São Francisco de Paula, que está localizado no planalto do nordeste gaúcho, na microrregião de Vacaria ou Campos de Cima da Serra. A área territorial do município é de 3.264,490 km<sup>2</sup>, fazendo dele hoje o 15º município do Estado em área, sendo o maior da mesorregião Nordeste (IBGE, 2018). Tal região do Rio Grande do Sul é formada pela união de 53 municípios da Serra Gaúcha, sendo as principais cidades Bom Jesus, Cambará do Sul, Esmeralda, Lagoa Vermelha, São Francisco de Paula, Vacaria, Caxias do Sul, Farroupilha e Bento Gonçalves. Tradicionalmente, o município não tem por característica a diversificação de culturas, privilegiando monocultura de pinus para extração de madeira e a produção de milho, batata, maçã e alho, com uma área estimada de 13.294 ha de área plantada; além de produção animal, principalmente bovinos, ovinos e galináceos. Contudo, ao longo dos últimos cinco anos vem aumentando o cultivo de soja na região chegando a 46,6% da área total plantada no município (SEBRAE, 2020). A região também apresenta um forte potencial turístico devido as suas atrações naturais além do potencial agroindustrial.

De acordo com os dados do Sistema Integrado de Gestão de Agrotóxicos (SIGA), fornecidos pela Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, os agrotóxicos mais utilizados no município de São Francisco de Paula em 2020 foram Mancozebe (77.921,435 Kg), Glifosato sal de potássio (25.095, 435 L) e Clorpiriforós (13.172, 580 L). As variedades agrícolas com maior demanda de agrotóxicos entre 2018 até o início de 2021 foram, também segundo o SIGA, a batata (6.004 solicitações), o milho (4.607), a maçã (2.711) e a soja (2.094) (RIO GRANDE DO SUL, 2019).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer e acompanhar marcadores ligados à composição bioquímica, ao balanço oxidativo e a fatores de condição nutricional em girinos de *Boana faber* (Hylidae), cujos ovos foram coletados no período de maior atividade reprodutiva da espécie (primavera e verão). Pretendemos, assim, padronizar esta espécie nesta fase do desenvolvimento como bioindicadora da Mata Atlântica, estabelecendo também biomarcadores que refletem a interação de substâncias químicas com o sistema biológico (biomarcadores de exposição e de efeito) ligados à possível disfunção metabólica e funcional quando expostos à formulação comercial contendo glifosato (Roundup® Original) em concentrações ecologicamente relevantes.

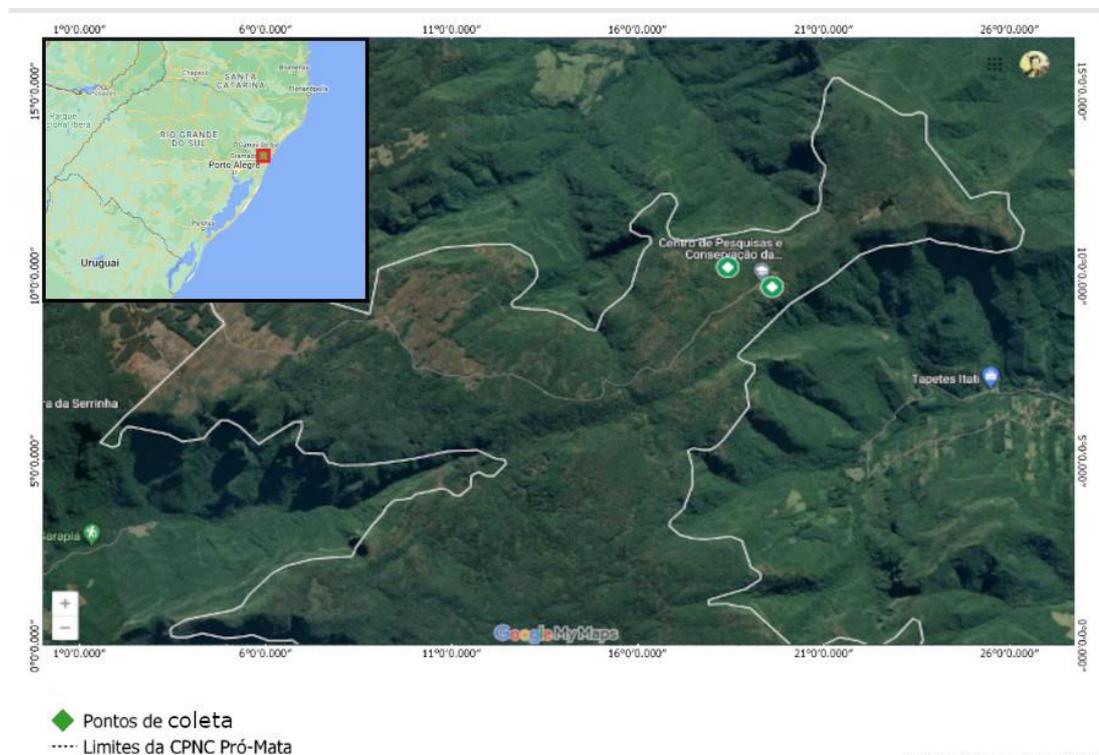
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar e analisar a atividade da enzima glutathione s-transferase (GST), uma enzima de fase II de biotransformação;
- Quantificar e analisar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como os níveis de marcadores de dano oxidativo através da lipoperoxidação (TBARS) e proteínas carboniladas (PC);
- Quantificar marcadores do metabolismo energético através da determinação dos níveis de glicogênio (GG), proteínas totais do animal (PT) e ácido úrico (AU) em homogeneizado total dos animais;
- Quantificar e analisar parâmetros morfométricos principalmente através da relação entre a massa corporal e o comprimento total dos animais, estabelecendo o fator K e o Kn;
- Relacionar e comparar as respostas obtidas para as diferentes concentrações do herbicida, possibilitando uma melhor compreensão do seu impacto biológico, sobre a espécie alvo deste estudo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram solicitadas as devidas autorizações legais junto ao Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio: 78625-1) e à Comissão de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS: 10622), bem como foi feito o registro de acesso ao patrimônio genético (SisGen) permitindo assim, o desenvolvimento deste estudo.

Este trabalho foi realizado em uma área pertencente ao domínio da Mata Atlântica formada por um mosaico de campos naturais associados a floresta subtemperada localizado no município de São Francisco de Paula (29°27' - 29°35'S e 50°08' - 50°15'W, altitude média de 912 m), estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil (FIG. 2). As áreas de estudo estão localizadas dentro do Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPCN Pró-Mata), uma área preservada de aproximadamente 4,500 ha. O clima do local é classificado como temperado superúmido (ROSSATO, 2011), com chuvas bem distribuídas pelo ano chegando a 1700–2000 mm e uma média anual de temperatura entre 14 - 17°C.



**Figura 2** - Local da coleta no Pró-Mata, próximo a sede (Fonte: Laura Kauer Schuck)

A coleta das massas de ovos foi realizada no mês de dezembro de 2021, próximo a corpos de água em diferentes pontos no pró-mata, onde normalmente são encontrados os

ninhos desta espécie. Acondicionamos todos os ovos encontrados em recipientes plásticos, um para cada ninho, contendo água do local de coleta, sob aeração constante. No momento da coleta dos ovos, nos sítios reprodutivos, verificamos os seguintes parâmetros abióticos: temperatura da água, pH e a saturação de oxigênio na água através de sondas específicas multiparâmetro, para que fossem usados como base para o cultivo dos ovos e girinos em laboratório.

Foram coletados no local os ovos contidos em pelo menos cinco ninhos diferentes (FIG. 3).



**Figura 3** – Foto da desova de *Boana faber* e dos locais de coleta (Fonte: Priscila Barth e Carolina Caberlon)

O nível de oxigênio dissolvido nos locais de coleta das desovas forma de 18,6% no local 1 e de 18,3% no local 2. A temperatura dos locais foram 21,1°C com uma umidade relativa do ar de 96%.

Os ovos foram transportados até o Centro de Modelos Biológicos (CEMBE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em 17/12/2021. Em seguida, foram acomodados em 3 aquários de 10L com água declorada por meio de kit anticloro da Labteste (pH= 6,6, O<sub>2</sub> (mg/L) = 15,7 e temperatura de 22,2 °C) a partir de água potável fornecida pelo Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Parâmetros abióticos da água dechlorada utilizada para preenchimento dos aquários durante todo o período de experimentação. Valores médios dos meses de dezembro/2021 e janeiro/2022 do Sistema Geral de Distribuição, mensurado pelo Dmae da cidade de Porto Alegre.

<b>pH</b>	6,35
<b>Turbidez</b>	0,52 UT
<b>Cor aparente</b>	5 mg Pt-Co/L
<b>Cloro residual livre</b>	0,80 mg Cl <sup>2</sup> /L
<b>Cloro residual combinado</b>	0,985 mg Cl <sup>2</sup> /L
<b>Coliformes fecais</b>	Ausente (em 100ml)

A eclosão iniciou em 20/12 e, em 23/12, todos os ovos haviam eclodido. Os juvenis ficaram somente com as reservas nutricionais alocadas da mãe por 16 dias (até 05/01/22) e, nesta fase, morreram apenas cinco animais. Neste período, os parâmetros da água destes aquários variaram pouco (pH= 7.3, O<sub>2</sub>= 28.56 mg/L, temperatura de 21,6 °C e amônia de 0,25 - 0,5 ppm).

Após esse período, os girinos foram deixados em 3 aquários de 10L separados para que se desenvolvessem até que atingissem o estágio 25 de Gosner, quando começam a se alimentar (GOSNER, 1960). Quando um número suficiente de animais atingiu entre os estágios 25-26 de Gosner eles foram separados em aquários de 5L, sendo cerca de 11 animais alocados por aquário perfazendo um total de 25 aquários e 282 girinos distribuídos igualmente entre eles. Do dia 6/1 até o dia 17/1 os girinos foram alimentados com ração para peixes (Alcon basic com 38% de proteína bruta), uma vez ao dia. Estes 12 dias constituíram o período de aclimação.

A sala de cultivo foi mantida em temperatura controlada em 22°C ± 2°C, ciclo circadiano 12h claro/12h escuro com os aquários sob aeração constante onde foram acompanhados diariamente os níveis de pH, condutividade, O<sub>2</sub> dissolvido e temperatura; além da amônia que foi acompanhada por meio de Kit da Alcon (Tabela 2). Toda vez que a amônia foi maior que 0,5ppm nós trocamos 2/3 da água do aquário.

**Tabela 2** - Parâmetros abióticos monitorados diariamente nos aquários durante o cultivo experimental de *Boana faber*.

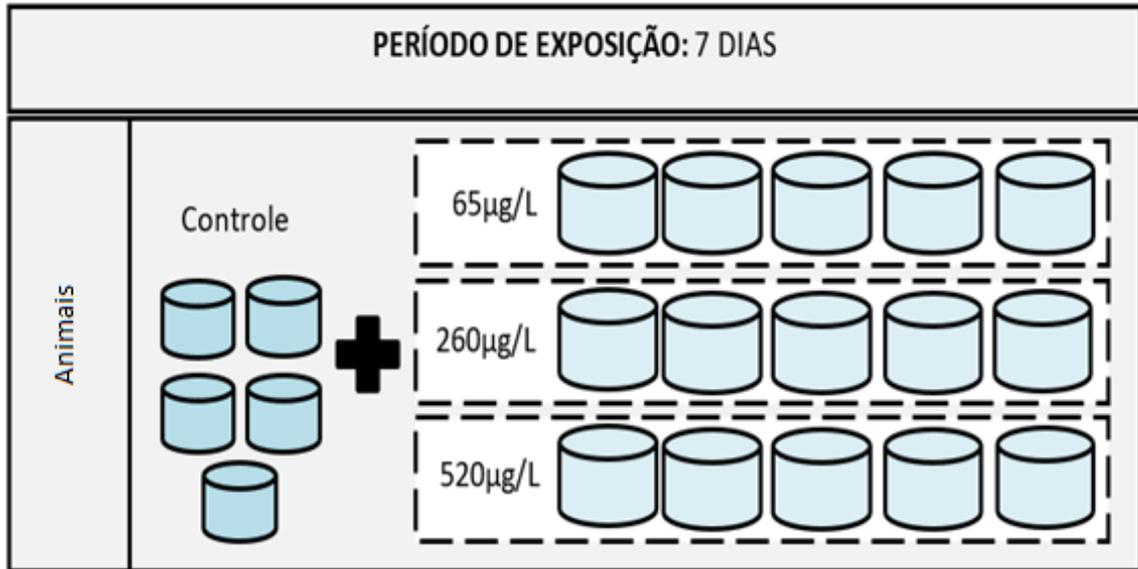
	pH	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	O <sub>2</sub> (mg/L)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Amônia (ppm)
Média	7.06	168,39	55,59	22,94	0,4
Desvio padrão	0.19	12,37	9,19	0,42	0,51
Erro padrão	0.043	2,41	0,98	0,14	0,03

Depois do período de aclimação, parte dos animais (Controle Dieta) foram pesados em balança eletrônica (precisão de 0,001 g) e o comprimento rostrocaudal foi mensurado com paquímetro digital (precisão de 0,01 cm), sendo acondicionados dois a dois em tubos do tipo eppendorf para serem crioeutanasiados em nitrogênio líquido e mantidos congelados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise dos biomarcadores. Foram reservados 18 - 19 animais para cada grande grupo de marcadores (balanço oxidativo, metabolismo e proteínas carboniladas).

O restante dos animais foi exposto a três diferentes concentrações (65, 260 e  $520 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) de glifosato) obtidas por cálculo matemático a partir de uma formulação comercial de herbicida contendo glifosato. Foi utilizada a formulação comercial Roundup® Original, tendo como princípio ativo o glifosato e contendo as seguintes especificações: sal de isopropilamina e n-(fosfometil) glicina em proporção de 480 g/L (48% m/v), equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (Glifosato) em proporção de 360 g/L (36% m/v) e ingredientes inertes em proporção de 684 g/L (68,4% m/v). Por fim, estabelecemos as concentrações a partir do limite máximo permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para Águas doces de classe 1 (CONAMA, 2005) que estabelece  $65 \mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato para esta classe de água doce e trabalhos que relatam este herbicida em águas superficiais do RS (PERUZZO *et al.*, 2008). Todas as outras concentrações já foram utilizadas em estudos anteriores e encontradas no ambiente natural da espécie.

Os grupos experimentais definidos foram: grupo dieta (CD), composto por 58 indivíduos coletados de cinco aquários ao fim do período de aclimação; controle experimental (CE), 56 animais não expostos aos herbicidas e que foram mantidos por todo o período de experimentação; glifosato (G1), exposto a  $65 \mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato; (G2), exposto a  $260 \mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato) e (G3), exposto a  $520 \mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato. Cada grupo experimental foi constituído de cinco aquários. Para os grupos expostos ao herbicida 56 animais foram

distribuídos em cinco aquários por grupo experimental, ou seja, 11 a 12 animais por aquário e o tempo de exposição foi de 7 dias (FIG. 4).



**Figura 4** - Esquema detalhando o desenho experimental e as concentrações aplicadas do herbicida (Fonte: autor)

Para o processo de contaminação da água dos aquários foi preparada uma solução mãe do herbicida contendo 1 g/L de glifosato; foi quantificada a concentração de glifosato na solução mãe no Laboratório de Química Analítica Ambiental (PUCRS) utilizando a metodologia proposta por Marques *et al.* (2009). Esta concentração foi de 1253 mg/L e não apresentou decaimento significativo ao longo de cinco dias.

Após o período de exposição, todos animais foram pesados, medidos e acondicionados dois a dois em tubos do tipo eppendorf para serem criotetanados em nitrogênio líquido e mantidos congelados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise dos biomarcadores. Foram reservados 18 animais para cada grande grupo de marcadores (balanço oxidativo, metabolismo e proteínas carboniladas).

### 3.1 DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE CONDIÇÃO

O fator de condição é um parâmetro que tem sido utilizado em peixes, refletindo as condições nutricionais recentes dos animais e fornecendo subsídios para análise do estado fisiológico, além de permitir a comparação de populações submetidas a condições ambientais e alimentares diversas (GOMIERO *et al.*, 2010; RODRIGUES e D'INCAO, 2014). Para os girinos foi determinado o fator de condição alométrico ( $K = (W/L^b) \times 100$ ), onde b é estimado

pela equação da relação peso/comprimento ( $Y = a.X^b$ , Y= comprimento e X é igual a massa corporal) (SANTOS, 1978). A partir do estabelecimento desta equação foi calculada a relação entre o valor de massa corporal observado e o esperado ( $K_n = \text{Massa observada}/\text{Massa esperada}$ ). A diferença entre K e  $K_n$  é que o primeiro mede o desvio de um indivíduo de um animal hipotético, enquanto o último mede o desvio de um indivíduo do peso médio a partir do comprimento.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DO BALANÇO REDOX

Para determinação dos marcadores do balanço oxidativo os girinos foram homogeneizados em Ultra-Turrax (IKA-WERK), em banho de gelo (0-4°C), em uma solução de tampão fosfato (20 mM) contendo cloreto de potássio (20 mM) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 1mM (inibidor de proteases), em uma proporção de uma grama de peso úmido para cada 6 mL de solução (massa:volume). Este homogeneizado foi centrifugado, em centrífuga refrigerada a 4°C, por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi retirado, aliquotado em quatro tubos do tipo eppendorf, identificados e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores; os precipitados foram desprezados. Para a normatização de todos os marcadores de balanço oxidativo foram quantificadas as proteínas contidas neste sobrenadante por meio de kit comercial (Biotécnica) com os resultados das proteínas expressos em mg/mL de solução. Esta quantificação das proteínas nos permitiu também termos uma precisão na oferta de proteínas a serem utilizadas nas quantificações dos diferentes marcadores de balanço oxidativo. Todos os marcadores do balanço oxidativo foram quantificados em pelo menos triplicata por eppendorf.

### 3.3 MARCADORES DO BALANÇO OXIDATIVO

Os níveis de lipoperoxidação foram determinados pela técnica de TBARS, que consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico, sob condições ácidas, e medir, espectrofotometricamente, a formação de um produto de cor rósea (BUEGE e AUST, 1978), com absorvância máxima em 535 nm. Adiciona-se, em um eppendorf de fundo redondo, 300 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, 100 µl do sobrenadante, 200 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% e 100 µl de água destilada, nesta ordem de adição, totalizando o volume de 700 µl. Em seguida, as amostras são incubadas a

100 °C por 15 minutos e, logo depois, resfriadas em banho de gelo durante 30 minutos. Após, acrescenta-se 600 µl de butanol, agita-se brevemente as amostras em agitador (Biomatic), estas são centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C durante 10 minutos a 3000 rpm. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em cubeta de quartzo, a partir do volume total de 400 µl de sobrenadante, utilizando-se a absorbância de 535 nm. A concentração de TBARS no sobrenadante do homogeneizado foi expressa em nmol de TBARS.mg de proteína<sup>-1</sup>.

A quantificação de proteínas carboniladas (PC) foi realizada pelo método descrito por Levine *et al.* (1994), no qual é necessário preparar o tampão de extração (0,5 mL Tris HCl 1M, 0,4 mL de EDTA 50 mM, 100 µL de PMSF 100 mM, 100 µL de Benzamidina 100 mM, H<sub>2</sub>O MilliQ q.s.p.) e as seguintes etapas: pulverizar o animal em nitrogênio líquido; adicionar 1mL do tampão de extração em cada amostra. Centrifugar a 10000 g por 15 minutos a 4°C. Coletar sobrenadante e utilizar imediatamente nos passos posteriores. Deve-se transferir 500 µL do extrato para novo tubo e adicionar 50 µL de Streptomicina (10%) e manter a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar a 10000 g por 10 minutos a 4 °C. Coletar sobrenadante e transferir para um tubo novo. Adicionar 500 µL de TCA 20% e manter a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar 10000 g por 10 minutos a 4°C e descartar sobrenadante. Ressuspender o precipitado em 500 µL de DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazine, 10 mM, 2M HCl). Incubar por 1 hora a temperatura ambiente, agitando a amostra de 15 em 15 minutos. Adicionar 500 µL de TCA 20% e manter a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar a 10000g por 10 minutos a 4°C e descartar sobrenadante. Lavar o precipitado com 1mL de Etanol: Acetato de Etila (1:1) e manter a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugar a 10000g por 3 minutos a 4°C. Repetir a lavagem por mais duas vezes. Ressuspender o precipitado em 0,6 mL de Ureia 6M (pH 2,4) e manter a temperatura ambiente por 15 minutos. Realizar leitura no espectrofotômetro em 370 nm (A370), utilizando o branco composto apenas por uréia (0,6 mL) para zerar o aparelho. O conteúdo de carbonil é medido pela fórmula Carbonil (µmoles) = (A370/22.000) x 1.000.000. O teor das proteínas totais ofertadas (medido por uso de kit comercial da BioTécnica) é utilizado no cálculo final da expressão das proteínas carboniladas (carbonil/teor de proteínas em mg).

A técnica para determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no sobrenadante baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina através da quantificação em unidades relativas, sendo que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente a 480 nm, em cinética enzimática (100'' com registro de 10 em 10'')

para três curvas com concentração crescente de amostra (10 µl, 20 µl e 30 µl). O meio de reação empregado consiste em glicina-NaOH (50 mM, pH 10,5) e adrenalina (1mM) (BOVERIS e CADENAS, 1982). A quantificação da atividade da SOD é expressa em unidades de SOD.mg de proteína-1.

Para a determinação da Catalase (CAT), a ativação prévia do sistema enzimático pode ser necessária antes da realização da leitura da reação no espectrofotômetro. A ativação da CAT no sobrenadante foi realizada adicionando-se 5µl de etanol a um eppendorf com 50 µl de amostra e, após banho de gelo durante 30 minutos, adiciona-se 5 µl de Triton X-100, um detergente não iônico (GALBRAITH *et al.*, 1983), em uma proporção final de 1:10:1, com uma relação v:v:v. Após estes procedimentos, as amostras foram lidas em cubeta de quartzo, adicionando-se 955 µl de tampão fosfato e 10 µl de homogeneizado do tecido; após, zera-se o espectrofotômetro e, por fim, adiciona-se 35 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração final de 50 mM). A leitura no espectrofotômetro foi realizada com absorvância de 240 nm, em cinética enzimática (100" com registro de 10 em 10"). Para a expressão dos resultados, foram quantificadas as proteínas da amostra (BOVERIS e CHANCE, 1973) e os resultados expressos em pmoles CAT.mg proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

A atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) no sobrenadante foi medida de acordo com o método descrito por Boyland e Chasseaud (1969), através da quantificação da conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH), catalisada pela GST, produzindo um composto que pode ser detectado em 340 nm, em cinética enzimática (100" com registro de 10 em 10"), onde a atividade da GST se dá de acordo com o aumento nos valores da absorvância, e é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABIG e JAKOBY, 1981). 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 é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH e 1 mM de CDNB. A atividade da GST é expressa como mmoles de conjugado CNDB.min-1.mg proteína-1.

#### 3.4 MARCADORES DE METABOLISMO

Para a dosagem do glicogênio, ácido úrico e proteínas totais dos animais, 0,4 µl de KOH foram adicionados aos eppendorfs em cada uma das amostras, sendo estas colocadas em banho fervente (100 °C) por 4 horas.

Após, os níveis de proteínas totais foram estimados usando o kit da Biotécnica®, esta técnica se baseia na reação do íon cobre com as ligações peptídicas das proteínas séricas em meio alcalino (Biuret Reagent). Esta reação produz um líquido roxo com absorvância máxima em 545 nm.

Os níveis de ácido úrico foram quantificados usando um kit de ensaio disponível comercialmente (Ácido Úrico - Biotécnica®), que se baseia na oxidação catalisada por uricase do ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogênio. A leitura dos níveis de ácido úrico se deu em 505 nm.

O glicogênio foi extraído segundo Van Handel (1965) e quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), utilizando-se Kit Biotécnica (Glicose), tendo como princípio o método da glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra, com absorvância máxima em 505 nm.

Todos foram medidos espectrofotometricamente, em triplicata, em um sistema CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian. Os resultados de proteínas totais, ácido úrico e glicogênio foram expressos em mg/g de peso úmido.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão e analisados quanto à normalidade pelo teste de D'Agostino-Pearson e homogeneidade pelo teste de Levene e teste de Bartlett.

Quanto a comparação dos grupos CD e CE, para aferição da normalidade ou não dos dados foi aplicado o teste D'Agostino & Pearson, caso fossem paramétricos usamos o teste T não-pareado e, caso os dados tenham tido distribuição não-paramétricos, foi aplicado o teste de Mann Whitney.

Para a análise dos diversos parâmetros que foram quantificados para os girinos do grupo controle exposição (CE) e os expostos as diferentes concentrações de glifosato (G1, G2 e G3) foi aplicado o teste de análise de variância de uma via seguida pelo teste complementar de Games-Howell ou LSD (somente para a SOD), caso os dados se mostrassem paramétricos, ou teste de Kruskal-Wallis seguido do complementar de Dunn, caso não sejam paramétricos.

Foi adotado o nível de significância de 5%, e as análises estatísticas serão realizadas com os programas Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) e GraphPad Prism 9 for Windows.

## 4 RESULTADOS

A comparação entre os resultados do grupo Controle Dieta (CD), que ficou por 12 dias em condições controladas após atingir o estágio 25 de Gosner, e o grupo Controle Exposição (CE), que ficou por 19 dias em condições controladas, também sem exposição ao herbicida, é apresentada na Tabela 3. O ácido úrico teve um valor 15% menor no grupo CE (0,225 mg/g) e o glicogênio um valor 29% menor (0,015 mg/g) em comparação ao grupo CD. Pelo contrário, a catalase apresentou um valor significativo 26% maior (23,106 pmol/mg.proteínas.min) no grupo CE. Ressalta-se que a diferença entre todos esses grupos descritos foi significativa.

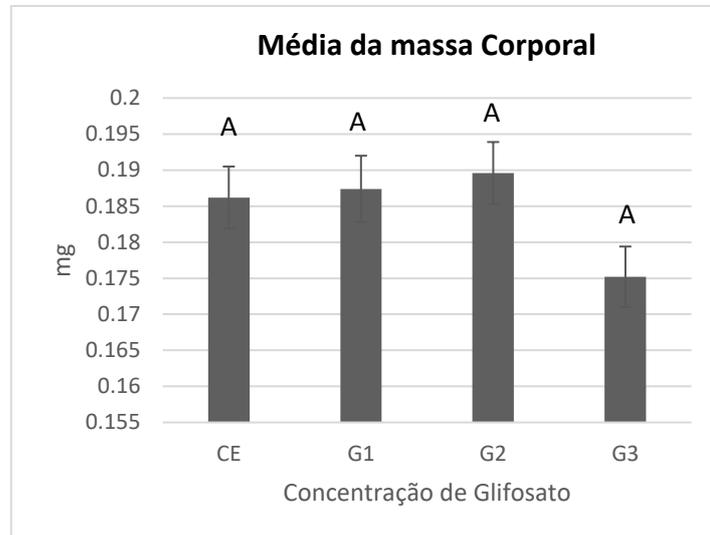
**Tabela 3** - Valores obtidos nos grupos controle para os parâmetros analisados no cultivo de *Boana faber* expostos ao glifosato. Período de aclimação (12 dias) e exposição (7 dias). Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* =  $p < 0,05$ . Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Parâmetros	Dieta (CD)	Exposição (CE)
Comprimento (mm)	21.657 $\pm$ 0.385	23.109 $\pm$ 0.315
Massa (g)	0.102 $\pm$ 0.006	0.093 $\pm$ 0.002
Fator K	1.100 $\pm$ 0.056	0.960 $\pm$ 0.020
Fator Kn	3.258 $\pm$ 0.169	2.888 $\pm$ 0.061
Proteínas totais dos animais (mg/g)	182,05 $\pm$ 6,65	174,27 $\pm$ 6,96
Glicogênio (mg/g)	0,021 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,003*
Ácido úrico (mg/g)	0,264 $\pm$ 0,09	0,225 $\pm$ 0,004*
SOD (U SOD/mg de proteínas)	21,477 $\pm$ 1,772	23,604 $\pm$ 2,987
CAT (pmol/mg.proteínas.min)	18,360 $\pm$ 12,338	23,106 $\pm$ 6,967*
GST (nmoles/mg.proteínas.min)	0,843 $\pm$ 0,091	0,638 $\pm$ 0,235
TBARS ( $\mu$ mol/mg de proteínas)	24,251 $\pm$ 5,882	48,628 $\pm$ 11,627
Proteínas carboniladas ( $\mu$ M Carbonil)	14,494 $\pm$ 5,292	13,727 $\pm$ 5,897

### 4.1 MASSA, COMPRIMENTO E FATORES DE CONDIÇÃO CORPORAL

Não houve diferença significativa entre a massa corporal dos girinos do grupo CE (0,1645 g) e todos os grupos expostos ao glifosato. No entanto os valores de G3 ficaram 92% menores em relação ao grupo G2 (FIG. 5).

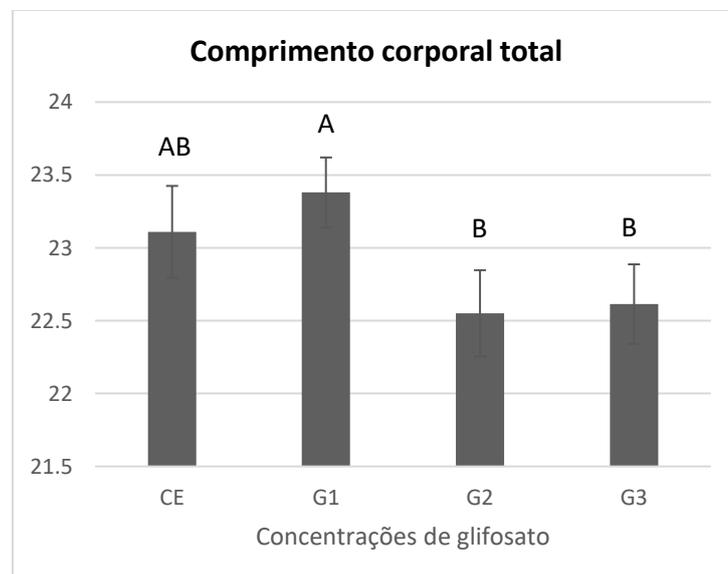
#### 4.1.1 Massa



**Figura 5** - Massa dos animais expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 Comprimento

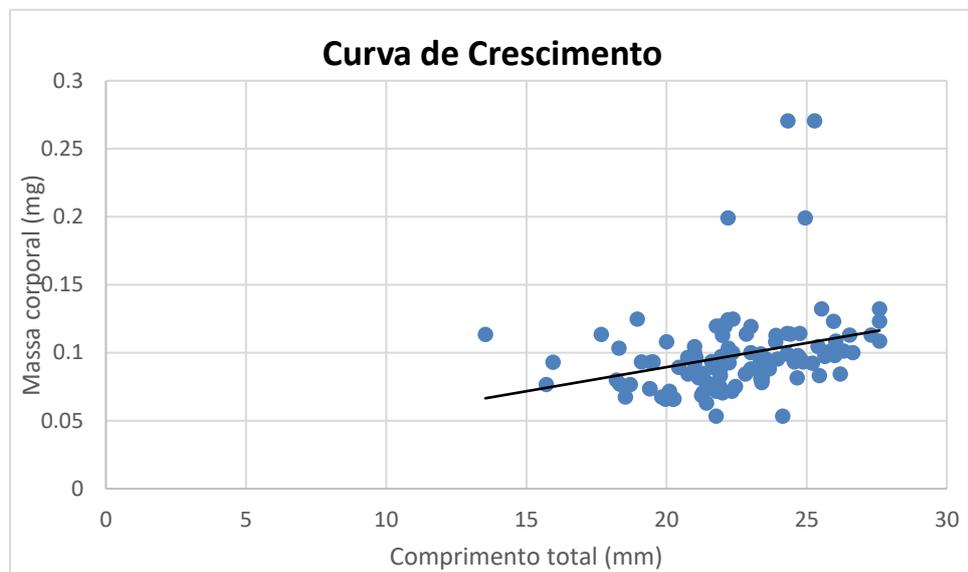
O comprimento dos animais também não diferiu estatisticamente entre o grupo controle exposição e os girinos dos grupos expostos ao glifosato; contudo, quando comparamos os diferentes grupos expostos entre si verificamos uma diminuição de cerca de 50% no comprimento corporal total dos animais expostos as maiores concentrações de glifosato (G2 e G3) (FIG. 6).



**Figura 6** - Comprimento dos animais expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

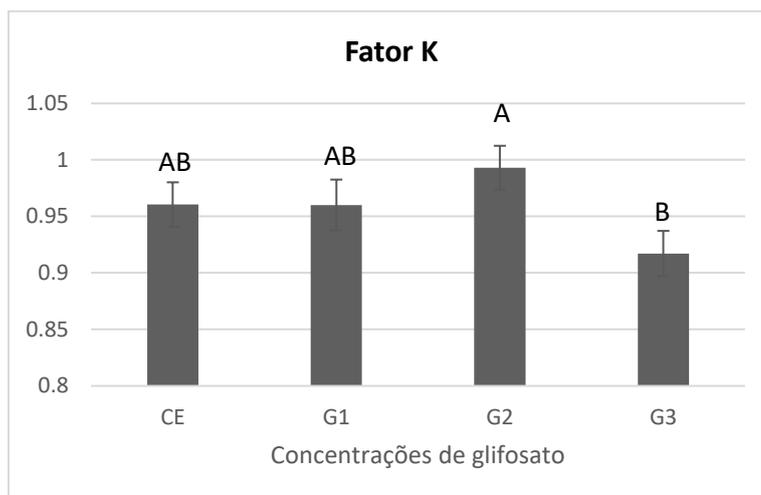
#### 4.1.3 Fatores de condição K e Kn

A relação peso comprimento nos girinos de *Boana faber* foi estimada com os valores de massa corporal e comprimento total dos girinos dos grupos controle (CD e CE) pela equação  $W = 0,013 \cdot L^{0,6397}$ ; onde o valor do coeficiente b, o expoente da equação foi de 0,6397 (FIG. 7). Isto indica um padrão de crescimento alométrico negativo ( $b < 3$ ).



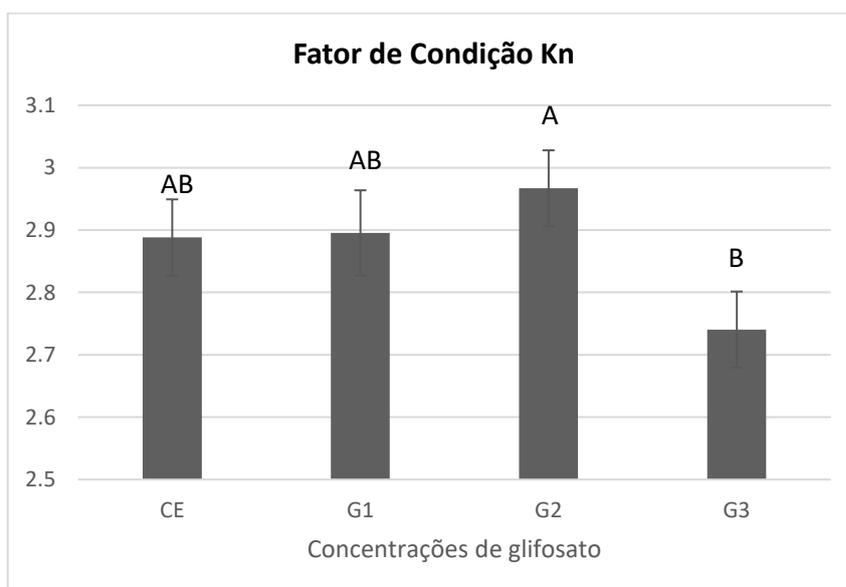
**Figura 7** - Curva de crescimento estabelecida através da relação entre a massa corporal e o comprimento total dos animais dos grupos controle (CD e CE).

O fator K, obtido pela relação entre a massa observada e a massa esperada, não diferiu significativamente entre o grupo CE (média:  $0,96 \pm 0,019$ ) e os demais grupos expostos ao glifosato, G1 ( $0,96 \pm 0,0022$ ), G2 ( $0,99 \pm 0,019$ ) e G3 ( $0,91 \pm 0,02$ ). No entanto, o grupo G2 diferiu de forma significativa do grupo G3, onde observamos uma redução de 9% (FIG. 8).



**Figura 8** – Fator K (massa observada/massa esperada) dos girinos expostos a concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

Com relação ao fator de condição alométrico, calculado a partir da curva de crescimento, os valores do fator  $K_n$  ( $K_n = (W/L^b) \cdot 100$ ) não diferiram estatisticamente entre os grupos CE e os demais grupos expostos ao glifosato. Contudo, houve diferença significativa entre o grupo G2 e G3, sendo o primeiro 9,72% maior (FIG. 9).

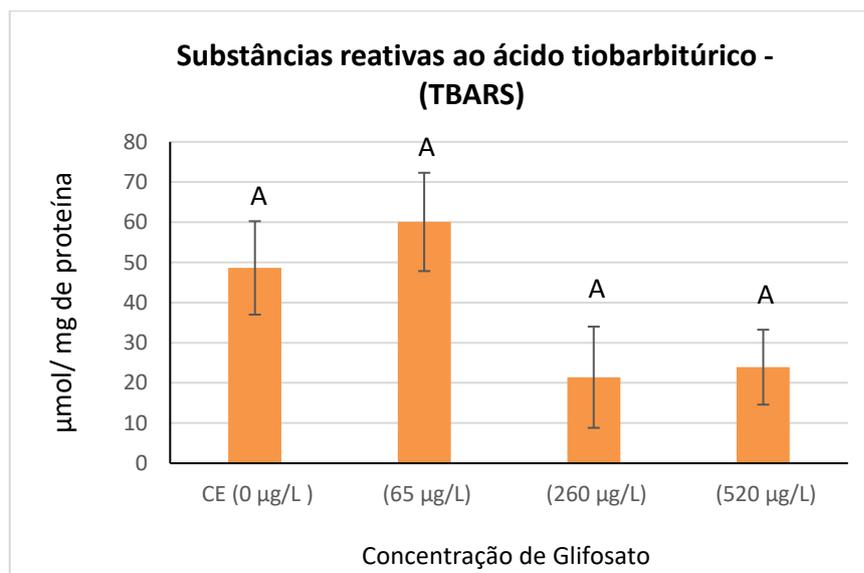


**Figura 9** - Fator de condição alométrico ( $K_n$ ) dos animais expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

## 4.2 MARCADORES DE BALANÇO OXIDATIVO

### 4.2.1 Lipoperoxidação

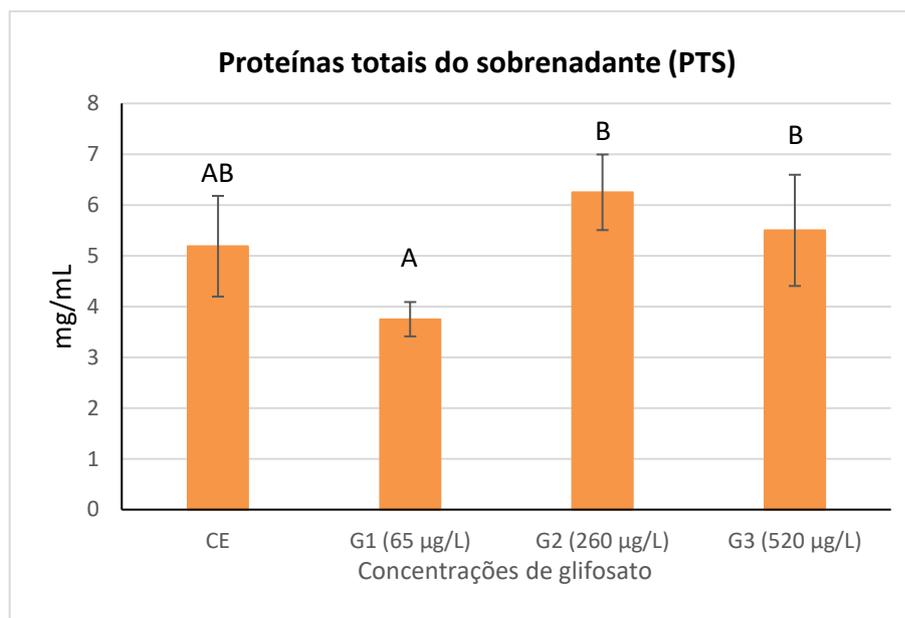
Os níveis de lipoperoxidação de nenhum grupo variou estatisticamente (FIG. 10). No entanto, os grupos G2 e G3 ficaram 56 e 51% menores que o controle exposição, respectivamente.



**Figura 10** - Níveis de TBARS nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

### 4.2.2 Proteínas totais do sobrenadante (PTS)

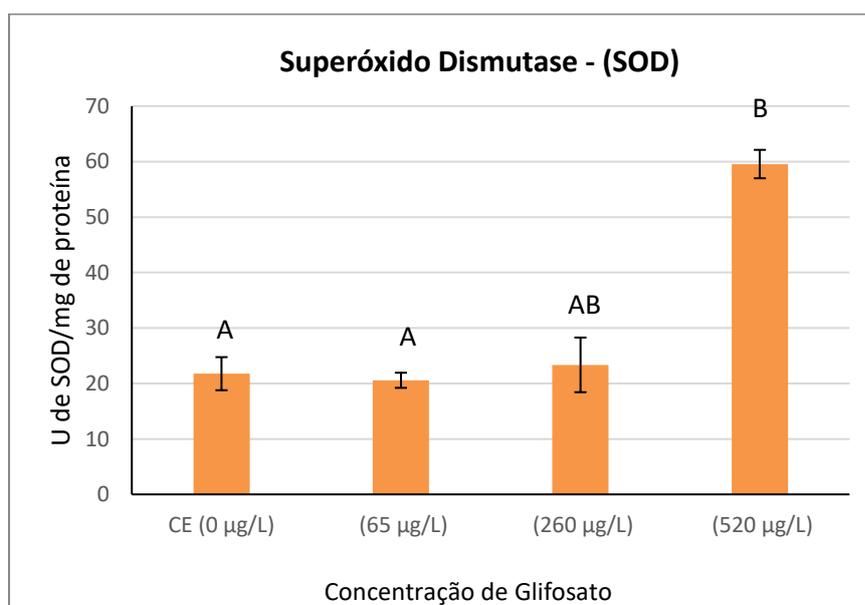
Os níveis de proteínas totais do sobrenadante não diferiram significativamente entre o controle exposição (CE) e os grupos expostos ao herbicida Roundup® nas três concentrações utilizadas. A maior diferença foi observada entre CE (média 5,18 mg/ml) e o grupo G1 (3,75 mg/ml), sendo o valor deste último 28% menor que o controle. Contudo, quando comparamos os grupos expostos entre si verificamos uma diferença significativa entre o grupo G1 e os grupos G2 e G3 (FIG. 11).



**Figura 11** - Níveis de proteínas totais do sobrenadante nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3 Superóxido dismutase

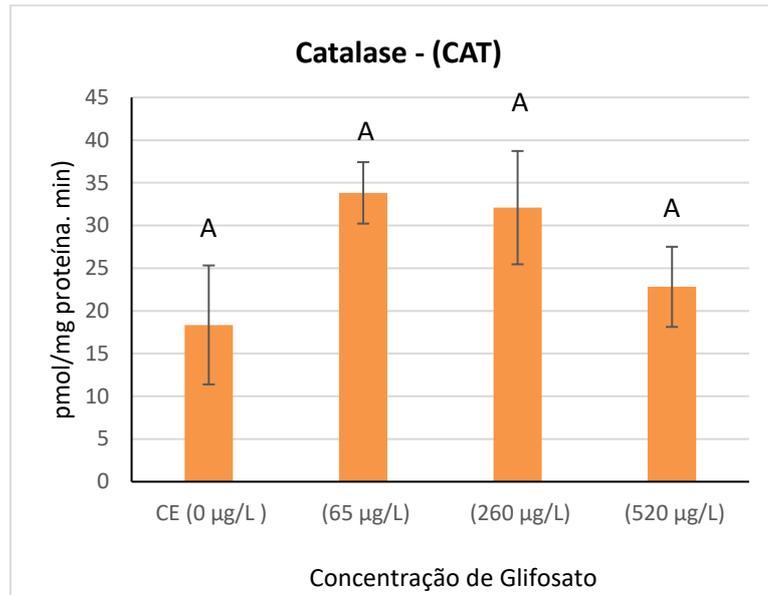
Os níveis de SOD diferiram estatisticamente entre o grupo CE e G3 (520  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sendo este 173% maior que o controle exposição ( $H(4) = 10,84$ ,  $p = 0,0283$ ). O grupo G1 apresentou os menores níveis de SOD (média: 20,57, erro padrão:  $\pm 1,36$ ) (FIG. 12).



**Figura 12** - Níveis de SOD nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4 Catalase

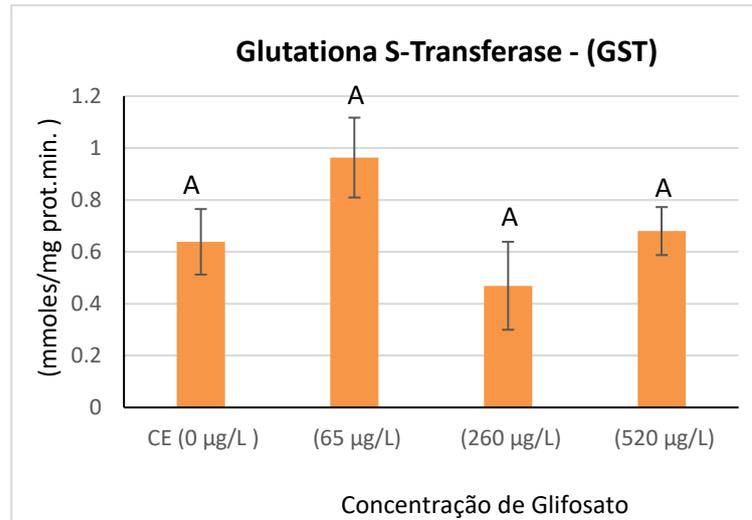
Todos os grupos expostos a concentrações de glifosato apresentaram valores maiores que o grupo controle exposição. No entanto, a grande variabilidade dos dados não permitiu acessar uma diferença estatisticamente significativa entre este grupo e os grupos expostos ao herbicida (Fig. 13).



**Figura 13** - Níveis de CAT nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5 Glutathiona s-transferase

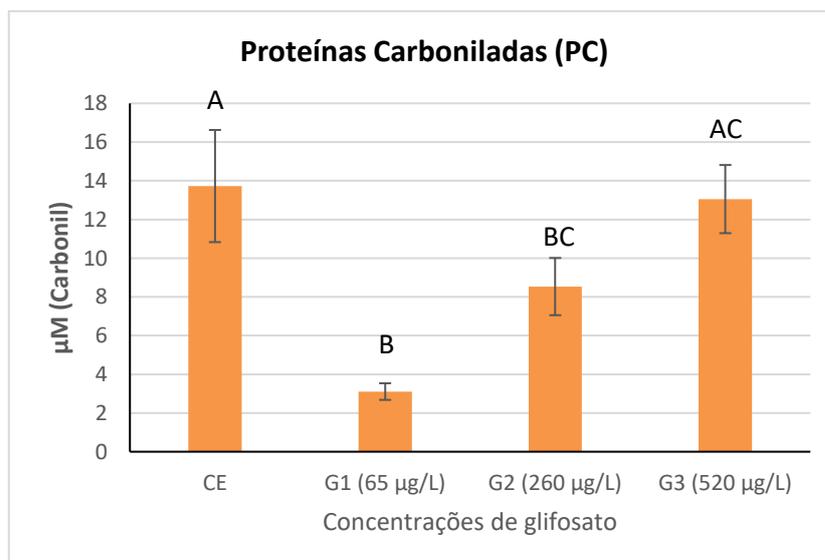
Quanto aos níveis de atividade da Glutathiona S-Transferase, nenhum grupo apresentou níveis estatisticamente diferentes do controle exposição, embora se possa observar uma tendência de aumento no grupo G1, ou seja, um valor 52% maior que o controle exposição (FIG. 14).



**Figura 14** - Níveis de GST nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.2.6 Proteínas carboniladas

Os níveis de proteínas carboniladas variaram significativamente entre os grupos CE e G1 e G2, embora não entre o controle e G3. O grupo G1 apresentou o menor nível de oxidação proteica quando comparado aos demais, sendo 22,5% menor que os do controle). Além disto observamos uma resposta concentração dependente dos níveis de PC dos valores obtidos para os grupos expostos (FIG. 15).

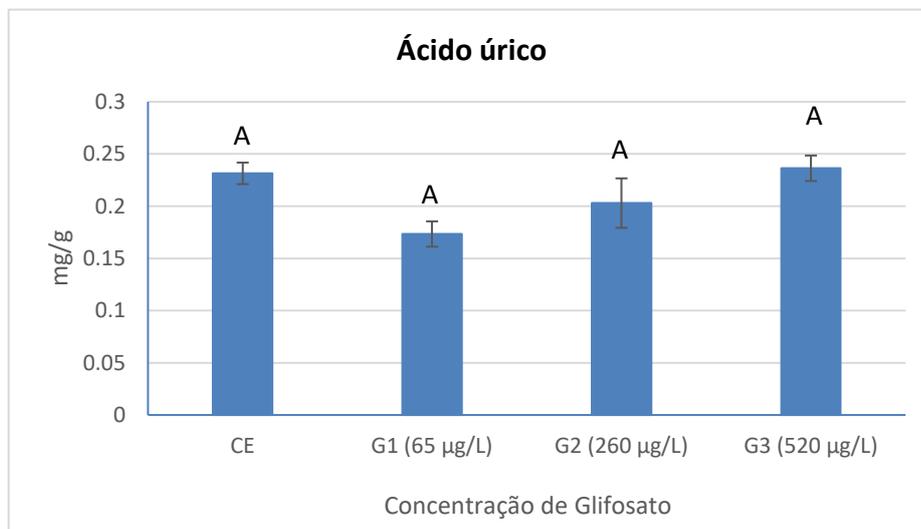


**Figura 15** - Níveis de proteínas carboniladas nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

### 4.3 MARCADORES DO METABOLISMO

#### 4.3.1 Ácido úrico

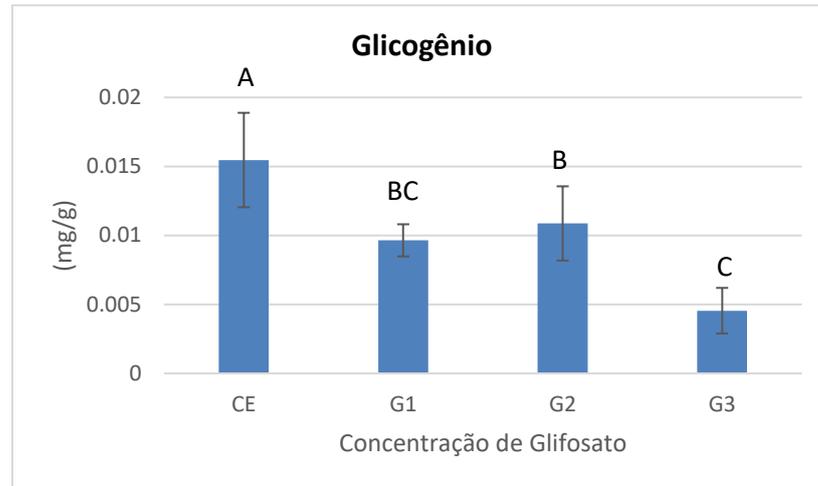
Os níveis de ácido úrico não diferiram significativamente entre o controle exposição (CE) e os grupos expostos ao herbicida Roundup® nas três concentrações utilizadas. A maior diferença foi observada entre CE (média: 0,225 mg/g) e G1 (média: 0,173 mg/g), sendo o valor deste último 22% menor que o controle (FIG.16).



**Figura 16** - Níveis de ácido úrico nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2 Glicogênio

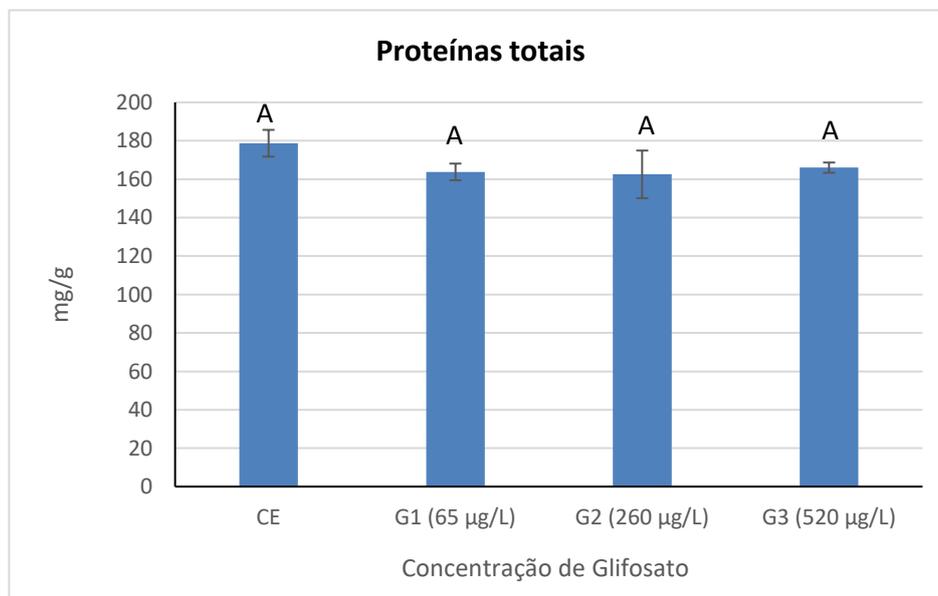
Quanto aos níveis de glicogênio, em todos os grupos expostos às diferentes concentrações de glifosato observamos valores significativamente menores dos que os observados para o grupo controle exposição. O grupo exposição G3 apresentou a menor média de glicogênio, um valor 75% menor que o CE (FIG. 17).



**Figura 17** - Níveis de glicogênio nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3 Proteínas totais

Os níveis de proteínas totais não diferiram significativamente nem entre o controle exposição (CE) e os grupos expostos ao herbicida Roundup® nas três concentrações utilizadas, e nem quando comparamos os grupos expostos entre si (FIG. 18).



**Figura 18** - Níveis de proteínas totais nos grupos expostos a três concentrações crescentes do herbicida glifosato. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para um  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a analisar a biodisrupção metabólica e funcional dos efeitos de concentrações ecologicamente relevantes de uma formulação comercial à base de glifosato, um herbicida comumente utilizado no Brasil, durante um período de exposição de 7 dias, sobre girinos da espécie nativa do anfíbio *Boana faber*. Alves-Ferreira *et al.* (2023), trabalhando com girinos de *B. faber* expostos à mesma formulação comercial deste estudo (Roundup Original®), estabeleceram uma LC<sub>50</sub> em 96h de 7.45 mg i. a./L. Apesar de termos utilizado concentrações de 13 até 115 vezes menores que essa LC<sub>50</sub>, fomos capazes de observar efeitos sub letais deste herbicida nos níveis de glicogênio e de atividade da superóxido dismutase (SOD) na comparação do grupo controle exposição com os grupos expostos.

A comparação entre os resultados do grupo Controle Dieta (CD) e o grupo Controle Exposição (CE) mostrou uma diminuição nos níveis de glicogênio e ácido úrico, aliado a um incremento da atividade da catalase. Tais diferenças podem indicar que, durante o período adicional da dieta, os girinos apresentaram certo grau de estresse maior, já que mesmo as condições de laboratório sendo cuidadosamente controladas elas não emulam perfeitamente o ambiente natural onde vive a espécie e, também, que iniciamos o experimento quando os animais estavam entre o estágio 25 e 26 de Gosner. Foi unicamente neste período, início da fase de alimentação, que observamos mortalidade entre os animais, atingindo níveis de 1,5%.

Uma meta-análise de 2013 (WAGNER *et al.*) sobre os efeitos de herbicidas à base de glifosato em anfíbios compila os resultados de diferentes estudos realizados até então. Os autores indicam que os efeitos crônicos e retardados do herbicida são específicos da formulação e da espécie. Segundo citação de Williams e Semlitsch (2010), a exposição a herbicidas à base de glifosato precipitou a metamorfose em *Rana cascadae* (CAUBLE, 2005) mas atrasou-a em *Lithobates pipiens* (CHEN *et al.*, 2004). Segundo os autores, essa diferença de toxicidade pode ser atribuída a duas causas: primeiro, as formulações diferem no sal de glifosato que incluem; e segundo, eles podem diferir no surfactante ou adjuvantes dentro do produto formulado. Da Silva *et al.* (2021), em seu estudo com girinos de *Melanophryniscus admirabilis* expostos a dois herbicidas à base de glifosato e sulfentrazone, ressaltam a existência de respostas que são específicas a cada espécie.

Além disso, também sustentam que, embora haja mais pesquisas sobre os efeitos toxicológicos do glifosato e de herbicidas à base de glifosato em anfíbios em comparação com

outros agrotóxicos, estudos sobre os efeitos de exposição subletal ainda não permitem conclusões mais completas do impacto toxicodinâmico devido à falta de dados. Um consenso deve-se à descoberta de que o estágio larval aquático é o estágio de vida mais sensível. Wagner (2013) também catalogou evidências de que a sensibilidade dos anfíbios aos herbicidas à base de glifosato é específica da formulação, da espécie e do estágio de vida (surfactantes > herbicida à base de glifosato > glifosato; Anura > Urodela; Hylidae > Ranidae > Bufonidae; larvas > embriões > juvenis e adultos).

Moutinho (2013) realizou um estudo sobre os efeitos de uma formulação comercial à base de glifosato isolado em larvas de *B. faber*, e seus resultados também não detectaram mortalidade significativa nos animais expostos, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Em ambos os estudos, mortalidade, massa e comprimento não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e os grupos expostos ao herbicida. Em concordância com a autora, nós também não observamos uma redução significativa do comprimento total e da massa total dos animais quando comparamos a concentração mais elevada de glifosato ( $520 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ao grupo controle exposição. Apesar disso, tanto massa quanto comprimento apresentaram valores médios menores no grupo G3, sugerindo uma tendência geral que afeta o desenvolvimento normal dos animais pertencentes ao grupo e que, possivelmente, estiveram sob nível incomum de estresse, ainda mais se consideramos esses resultados juntamente com os outros do nosso trabalho. No entanto, no estudo de Moutinho não foram avaliados os efeitos ecotoxicológicos em *B. faber* como no presente trabalho. Por outro lado, seus resultados demonstram que estágio de desenvolvimento da espécie foi significativamente afetado.

Para além da espécie, há vários estudos envolvendo a mesma família (Hylidae) que medem efeitos ecotoxicológicos do glifosato. Em *Pseudis minuta*, uma espécie desta família, Wingen (2022) não verificou diferenças significativas em nenhum dos biomarcadores analisados (SOD, CAT, GST e TBARS) entre os grupos expostos quando comparados ao controle. Ao contrário dos estudos recentes de Reichert (2022) e Wingen (2022), que não encontraram diferenças significativas nos níveis de SOD entre os grupos controle e os grupos exposição em *Rhinella icterica* (Bufonidae) e *Pseudis minuta* (Hylidae) respectivamente, nós encontramos uma diferença significativa nos níveis da enzima entre o grupo CE e o G3. A SOD cataliza a dismutação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e que, por sua vez, é transformado em água pela ação da catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx). Como a enzima antioxidante SOD teve um incremento de 3 vezes nos animais expostos a  $520 \mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato (G3), pode-se afirmar que houve uma maior

produção do ânion radical superóxido. Este incremento da formação do ânion radical superóxido induzido pela maior concentração do herbicida pode estar relacionado a uma maior demanda metabólica para metabolização deste xenobiótico. Tal fato é reforçado pela diminuição do glicogênio destes animais, reserva esta que atinge níveis 77% mais baixos que aqueles verificados no grupo controle. Reichert *et al.* (2022) já havia sugerido um incremento da demanda de ATP para sustentar mecanismos antioxidantes e de biotransformação em girinos expostos a herbicidas.

Este aumento de atividade da SOD coincide com os níveis mais baixos de TBARS, sugerindo um papel-chave desta enzima na prevenção da lipoperoxidação. Assim, supomos que as defesas antioxidantes não conseguiram neutralizar completamente as espécies reativas ao oxigênio (EROs). Também para Costa (2007), a exposição ao Roundup® aumentou a atividades hepática da SOD em 81% em *Lithobates catesbeiana* (Ranidae) quando comparados com animais do grupo controle. Já para da Silva (2021), os níveis de SOD ficaram significativamente reduzidos em girinos de *Melanophryniscus admirabilis* (Thiaridae) expostos a diferentes concentrações glifosato.

No campo da ecotoxicologia, historicamente tem se utilizado biomarcadores para a compreensão dos efeitos dos pesticidas em organismos vivo. São modificações moleculares, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser observáveis ou quantificáveis evidenciando que o organismo foi exposto a xenobióticos (LIONETTO *et al.*, 1993). Contaminantes ambientais podem causar danos oxidativos em animais aquáticos, por exemplo, através da indução à produção de espécies reativas de oxigênio e/ou diminuição das defesas antioxidantes, o que pode levar a deficiências na reprodução, alterações comportamentais e no desenvolvimento de girinos (COSTANTINI, 2014).

A elevação do dano oxidativo pode ser resultado da capacidade diminuída de eliminar EROs devido à baixa quantidade e/ou atividade diminuída das enzimas antioxidantes, como também da diminuição de moléculas antioxidantes, como observado durante a hibernação de *Nanorana parkeri* (NIU *et al.*, 2018). Em exposição aguda (quatro dias) houve aumento da SOD no fígado e brânquias, nas concentrações de 28 a 34 µg/L, próximas a utilizada no presente estudo (OWOLABI *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que, juntamente com a enzima antioxidante CAT, a SOD é a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. As EROs podem ser geradas, por exemplo, na fosforilação oxidativa, na interação com agentes patogênicos e na interação com agentes xenobióticos. No presente estudo, o incremento da SOD e a manutenção dos níveis de atividade da CAT e da GST, uma enzima chave na fase II na biotransformação de

xenobióticos, parece ter sido fundamental para estes animais conterem a lipoperoxidação (TBARS) e garantirem sua sobrevivência. Garcia *et al.* (2020) mostraram que os níveis de malondialdeído, um indicador de lipoperoxidação, diminuíram no fígado de lambari após a exposição à óleo diesel possivelmente por uma maior proteção antioxidante, metabolismo e excreção de malondialdeído na água. Além disto, cabe ressaltar que a atividade dessas enzimas pode ser mantida, aumentada ou diminuída, dependendo da espécie, do tecido e órgão analisado, além de fatores relacionados ao estressor e ao estresse imposto, como sua intensidade e duração (PERSCH *et al.*, 2017).

As proteínas carboniladas (PC) são consideradas o resultado da oxidação causada diretamente por EROs ou por produtos da lipoperoxidação. A carbonilação é normalmente considerada o resultado de espécies reativas de oxigênio que atacam a cadeia lateral da proteína. As EROs incluem hidroperóxido ou hidroperóxidos lipídicos. Tal estresse oxidativo, geralmente catalisado por metais, leva à carbonilação de proteínas (DALLE-DONNE, 2006). Sendo assim, a carbonilação de um resíduo pode ser suficientemente severa para causar a perda funcional de uma proteína, como acontece quando a oxidação de resíduos do aminoácido resulta na sua inativação (LEVINE, 1990).

Ao contrário do estudo de Reichert (2021), que mediu a concentração de PCs em anfíbios relativamente próximos da família Hylidae (WOMACK e BELL, 2020) expostos a glifosato, e que não detectou diferenças significativas entre o grupo CE e os grupos expostos ao herbicida, nós encontramos um aumento significativo entre o controle exposição e os grupos G1 e G2 nos níveis deste marcador. Isso foi demonstrado pelo aumento dose-dependente nos níveis de PC, sugerindo oxidação crescente de proteínas em girinos expostos ao glifosato, apesar de aumento dos mecanismos antioxidantes. Vale ressaltar que o padrão das médias encontrados pela autora são semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

No entanto, os níveis de PCs nos grupos mencionados ficaram menores que o controle exposição. Tais resultados, aliados ao baixo percentual de mortalidade constatado, nos permite sugerir que se deve à capacidade dos animais em se desenvolver mantendo ou até mesmo diminuindo os níveis de dano oxidativo (TBARS e PC) ao longo do período experimental, provavelmente às custas das reservas de glicogênio. Assim, sugerimos que o sistema antioxidante de *B. faber* apresentou capacidade de resistir a esse herbicida, embora ainda de forma limitada.

Adicionalmente, nossos dados demonstraram que *B. faber* teve fator de condição K (observado/esperado)  $< 1$  nos três grupos expostos ao herbicida, indicando deficiência nutricional, sendo G3 o grupo com menor fator de condição ( $0.917138 \pm 0,02$ ). Tal resposta

pode estar relacionada a um desvio das reservas energéticas destes animais para a biotransformação destes herbicidas e a ativação do sistema antioxidante levando a diminuição dos níveis de TBARS nos expostos a glifosato. Não podemos descartar também, alterações na atividade e no comportamento alimentar. No entanto, o fator K não diferiu significativamente entre o grupo CE ( $0,96 \pm 0,019$ ) e os grupos expostos ao glifosato. O fator de condição K teve valor maior do que 1 apenas no grupo CD (média: 1,10).

O fator de condição relativo (Kn) é um importante indicador do grau de hígidez de um indivíduo e seu valor reflete as condições nutricionais recentes e/ou gastos das reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies (GOMIERO *et al.*, 2010). O fator de condição Kn não diferiu estatisticamente entre o controle exposição e os grupos expostos ao glifosato. A maior diferença foi observada entre CE ( $2,857 \pm 0,062$ ) e o grupo G3 ( $2,78 \pm 0,063$ ), tendo o controle um valor 3% maior, ambos indicando uma condição subnutricional destes animais. Um valor de Kn menor que 3 para animais tende a ser interpretado como condição de desenvolvimento e nutrição insuficiente.

É preciso ressaltar também que há uma escassez de estudos sobre a família Hylidae. Estudos sobre a história natural de *B. faber*, por exemplo, historicamente restringiram-se ao comportamento de acasalamento, canto e sua taxonomia (MARTINS e HADDAD, 1988; SANTOS, 2011). Além disso, um estudo de 2023 acessou o efeito de Roundup na espécie, contudo, limitando-se a estimar a LC50-(96h) (ALVES-FERREIRA). Já o efeito de herbicidas é ainda menos conhecido nesse táxon. Neste estudo pudemos demonstrar um efeito negativo de concentrações ambientalmente relevantes de glifosato sobre girinos de *B. faber*, alterando marcadores do balanço oxidativo, do metabolismo energético e da condição corporal destes animais nesta fase do desenvolvimento. Dessa forma, considerando que o número de agrotóxicos liberados no mercado brasileiro só em 2022 foi 652, uma alta de 16% em relação a 2016, representando o maior número já registrado nos últimos 23 anos pela Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins (SALATI, 2023). Adicionalmente, levando em conta também que o último relatório do IPCC (2021) sustenta que o aquecimento global pode aumentar ainda mais o risco de extinção de espécies, defendemos ser urgente a ampliação dos estudos sobre esta classe tanto em laboratório quanto *in loco* frente aos diferentes agentes estressores isolados e associados aos quais está sujeita. Por fim, sabendo que os anfíbios são o segundo grupo mais ameaçado de extinção no planeta, destacamos a relevância do estudo aqui realizado e os resultados obtidos.

O estudo de Dornelles e Oliveira (2015) com a Rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*) reforça o que nós encontramos neste trabalho sobre os níveis de glicogênio de animais expostos a glifosato. Para as autoras, brânquias, fígado e músculos dos animais nos grupos expostos apresentaram níveis significativamente menores de glicogênio em comparação com o controle exposição. Além disso, o padrão de resposta do glicogênio à exposição ao herbicida foi o mesmo em todos os tecidos. O glicogênio é um carboidrato complexo armazenado no fígado e nos músculos de animais, incluindo humanos. É composto de muitas moléculas de glicose ligadas entre si em uma estrutura ramificada. Tem a função de fornecer uma fonte de reserva de glicose, que pode ser rapidamente decomposta em moléculas de glicose conforme necessário para fornecer energia ao corpo, demonstrando a importância do polissacarídeo para a homeostase energética e sobrevivência desses animais. As autoras sustentam que a depleção das reservas energéticas observadas no estudo pode estar associada à alta taxa de sobrevivência dos girinos expostos a baixas concentrações do herbicida glifosato. Da mesma forma, nós também observamos uma baixa taxa de mortalidade e uma diminuição intensa das reservas de glicogênio, especialmente nas maiores concentrações do herbicida (65 e 520  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de i.a.).

Embora espécies de anfíbios já tenham sido sugeridos como bioindicadores, *B. faber* nunca foi sugerida como potencial bioindicador de poluição ambiental gerada pelo herbicida em questão e para o bioma da Mata Atlântica (BACH *et al.*, 2016; MOUTINHO *et al.*, 2020). O presente trabalho, além de aprofundar a compreensão dos efeitos de uma formulação comercial de glifosato na espécie, também sugere padronizá-la como bioindicadora de outras espécies de anuros no bioma Mata Atlântida. Vale ressaltar que se trata de uma região que em 1500 possuía 1.000.000  $\text{km}^2$ , cobrindo praticamente a costa do Brasil; e que possui atualmente apenas 7% de sua extensão original. Sendo assim, visamos reforçar as evidências pré-existentes a respeito dos efeitos dos pesticidas mencionados anteriormente, tanto seus efeitos isolados quanto em mistura. Além disso, também reforçar a proposta de tornar *B. faber* uma bioindicadora da Mata Atlântida.

O estado de conservação da espécie, segundo a IUCN é de menor preocupação e a distribuição da mesma cobre a totalidade da área original da Mata Atlântica (LAVILLA *et al.*, 2010). Além disso, a baixa mortalidade observada dos animais durante o cultivo em laboratório reforça ainda mais a nossa sugestão para que esses animais sejam utilizados como indicadores ambientais do bioma.

## 6 REFERÊNCIAS

- AL-OTHMAN, A. M.; KHALED, S. A.; GABER, E. E.; KAREEM, Y.; ZEID, A. A.; MOURAD, A. M.; JOHN, P. G. Protection of  $\alpha$ -tocopherol and selenium against acute effects of malathion on liver and kidney of rats. **Afr J Pharm Pharmacol** 5:1263–1271. 2011. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.226>.
- ALVES-FERREIRA, G; KATZENBERGER, M.; FAVA, F. G.; COSTA, R. N.; CARILLO FILHO, L. M.; SOLÉ, M. Roundup Original DI® and thermal stress affect survival, morphology and thermal tolerance in tadpoles of *Boana faber* (Hylidae, Anura). **Ecotoxicology**. 32(1): 93-101. 2023. doi: 10.1007/s10646-023-02622-1.
- AMPHIBIAWEB. **Amphibian species lists**. University of California, Berkeley (2022) <http://amphibiaweb.org>. Accessed 19 august 2022.
- AMES, J.; MIRAGEM, A. A.; CORDEIRO, M. F. et al. Effects of glyphosate on zebrafish: a systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology** 31, 1189–1204. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02581-z>
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **J. Appl. Toxicol.**, 34, 458–479. 2014. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.
- BACH, N. C.; NATALE, G. S.; SOMOZA, G. M.; RONCO, A. E. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. **Environ. Pollut.** 2016. Res. 23, 23959e23971.
- BAGNYUKOVA, T.; STOREY, K.; LUSHCHAK, V. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **J Therm Biol** 28: 21-28. 2003. DOI: 10.1016/S0306-4565(02)00031-1.
- BAILLIE, J. E. M.; HILTON-TAYLOR, C.; STUART, S. N., editors. 2004. IUCN Red List of threatened species. A global species assessment. IUCN, Gland, Switzerland.
- BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment**, 1: 87-94. 2003. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0087:TCODA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0087:TCODA]2.0.CO;2).
- BLAUSTEIN, A. R.; ROMANSIC, J. M.; KIESECKER, J. M.; HATCH, A. C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, 9: 123-140. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00015.x>.
- BLAUSTEIN, A. R.; WALLS, S. C.; BANCROFT, B. A.; LAWLER, J. J.; SEARLE, C. L.; GERVASI, S. S. Direct and Indirect Effects of Climate Change on Amphibian Populations. **Diversity**. 2010, 2, 281-313. <https://doi.org/10.3390/d2020281>.
- BONFANTI, P.; SAIBENE, M.; BACCHETTA, R.; MANTECCA, P.; COLOMBO, A. A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. **Aquat Toxicol**. 2018. Feb; 195:103-113. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.12.007. Epub 2017 Dec 24. PMID: 29306033.
- BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M. Effects of pesticides on amphibian populations. Pages 152-167 in R. D. 2003. Semlitsch, editor. **Amphibian Conservation**. Smithsonian Institution, Washington.
- BOYER, R; GRUE, C. E. The need for water quality criteria for frogs. **Environmental Health Perspectives** 103:4. 1995. CID: <https://doi.org/10.1289/ehp.95103352>.
- BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. The Role of Glutathione and Glutathione S-Transferases in Mercapturic Acid Biosynthesis. In **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, F.F. Nord (Ed.). 1969. <https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch5>.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide in mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. CRC Press, Boca Raton. Superoxide Dismutase Vol. II (Oberley, L.W., ed.) p. 15-30. 1982.

- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemistry Journal**. v. 134. n. 6, p. 707-716. 1973. <https://doi.org/10.1042/bj1340707>.
- BROWNE, A. M.; MOORE, P. A. The effects of sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide (2,4-D) on feeding behaviors of the crayfish *O. rusticus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 2014. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0032-8>.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation, Editor(s): Sidney Fleischer, Lester Packer. **Methods in Enzymology**. Academic Press, v. 52, p. 302-310. 1978. ISSN 0076-6879, ISBN 9780121819521. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- BURGER, J. Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. **Environmental Bioindicators**, 1:1, 22-39. 2006. DOI: 10.1080/15555270590966483.
- CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. DE O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, Vol 12, Iss 1, Pp 1-8. 2018. Doi: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n1a10.1-8>.
- CAUBLE, K; WAGNER, R. S. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. **B Environ Contam Tox** 75:429–435. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3>. Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins (CGAA) do Ministério da Agricultura.
- CHAMPE, C.; HARVEY, R. A. Metabolismo dos lipídeos complexos e colesterol e metabolismo dos esteróides. In: Champe PC, Harvey RA (eds) **Bioquímica Ilustrada**, 2ath edn. Artes Médicas, Porto Alegre, pp 199–242. 2006.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** 61, 192–208. 2004. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>.
- CHEN, C. Y.; HATHAWAY, K. M.; FOLT, C. L. Multiple stress effects of Vision herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. **Environ Toxicol Chem.** 23:823–831. 2004. Doi: 10.1897/03-108.
- ÇİÇİK, B.; ENGİN, K. The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**: Vol. 29: No. 1, Article 19. 2005. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol29/iss1/19>.
- COLTRO, M. L.; SILVA, P. R.; VALGAS, A. A. N.; MIGUEL, C.; FREITAS, B. S.; OLIVEIRA, G. T. Influence of the herbicide facet® on corticosterone levels, plasma metabolites, and antioxidant system in the liver and muscle of American Bullfrog Tadpoles. **Water Air Soil Pollut.** 228 (7), 228–241. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3404-7>.
- CONAMA n.º 357, de 17 de março de 2005. “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.” Diário Oficial da República Federativa do Brasil de 17 de março de 2005, p. 58-63.
- COSTANTINI, D. Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology. In **Springer Berlin Heidelberg**. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-54663-1>.
- COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA-NETO, A. L. et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology** 17, 153–163. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0178-5>.
- CRAVEN, J.; DESBROW, B.; SABAPATHY, S.; BELLINGER, P.; MCCARTNEY, D.; IRWIN, C. The effect of consuming carbohydrate with and without protein on the rate of muscle glycogen re-synthesis during short-term post-exercise recovery: a Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Med Open.** 2021 Jan 28;7(1):9. doi: 10.1186/s40798-020-00297-0.

- DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. 10 (2): 389–406. 2006. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x.
- DA SILVA, P. R.; BORGES-MARTINS, M.; OLIVEIRA, G. T. Melanophryniscus admirabilis tadpoles' responses to sulfentrazone and glyphosate-based herbicides: an approach on metabolism and antioxidant defenses. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2020 Jan; 28(4):4156-4172. doi: 10.1007/s11356-020-10654-x.
- DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D.; GREEN, D. E.; SPEARE, R. Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. **Emerg Infect Dis**. 5(6):735-748. 1999. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990601>.
- DOMINGUES, F. Entenda o que é o glifosato, o agrotóxico mais vendido do mundo. G1, 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/natureza/noticia/2019/05/26/entenda-o-que-e-o-glifosato-o-agrotoxico-mais-vendido-do-mundo.ghtml>. Acesso em: 11/11/2022.
- DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Arch Environ Contam Toxicol**. Apr;66(3):415-29. 2014. doi: 10.1007/s00244-013-9967-4. Epub 2013 Nov 26.
- DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environ Sci Pollut Res Int** 23(2): 1610 – 1620. 2015. DOI: 10.1007/s11356-015-5388-4.
- EZEMONYE, L.; TONGO, I. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. **Jordan J Biol Sci** 2:29–36. 2009.
- GANESHWADE, R. Biochemical changes induced by dimethoate (Rogor 30% EC) in the gills of freshwater fish *Puntius ticto* (Hamilton). **Journal of Ecology and the Natural Environment**. 4. 2012. Doi: 10.5897/JENE11.134.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDIX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cellcycle in intact plant-tissues. **Science**. v. 220 (4601). p. 1049-1051. 1983. DOI: 10.1126/science.220.4601.1049.
- GARY, W.; BARTON B. B.; MCLEAY, D. J. Stress and acclimation. **Methods for fish biology**. Bethesda, MD: American Fisheries Society. (451)- (489). 1990. doi: <https://doi.org/10.47886/9780913235584.ch14>.
- GERHARDT, A. L. Bioindicator Species and Their Use in Biomonitoring. 2011. Environmental Monitoring—Vol. I—Bioindicator Species and Their Use in Biomonitoring, **Encyclopedia of Life Support Systems** (EOLSS).
- GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A. DATTA, S.; GIRDHAR, M. Glyphosate toxicity for animals. **Environ Chem Lett** 16, 401–426. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>.
- GLANTZOUNIS, G. K.; SALACINSKI, H. J.; YANG, W.; DAVIDSON, B. R.; SEIFALIAN, A. M. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. **Liver Transpl**. 2005 Sep;11(9):1031-47. doi: 10.1002/lt.20504.
- GOSNER, K. L. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. **Herpetologica** v. 16, n. 3, p. 183-90. 1960. <http://www.jstor.org/stable/3890061>.
- GOMIERO, L. M.; VILLARES J.; BRAGA, G. A.; de SOUZA, F. M. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica** [online]. v. 10, n. 1 Acessado 31 maio 2021. p. 101-105. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000100009>.
- GRIPP, H. S.; FREITAS, J. S.; ALMEIDA, E. A.; BISINOTI, M. C.; MOREIRA, A. B. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix*

nattereri: Leiuperidae). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 136, 173–179. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.027>.

GÜNGÖRDÜ, A.; UÇKUN, M.; YOĞLU, E. Integrated assesment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion- based pesticides in single and combination forms. **Chemosphere**, 144:2024 –2035. 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.125>.

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANTI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, Volume 16, Issue 5, Pages 490-491. 2015.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8).

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods in Enzymology**, Academic Press, V. 77, P. 218-231, 1981. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77029-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77029-0).

HELANDER, M.; LEHTONEN, T. K.; SAIKKONEN, K.; DESPAINS, L.; NYCKEES, D.; ANTINOJA, A.; SOLVI, C.; LOUKOLA, O. J. Field-realistic acute exposure to glyphosate-based herbicide impairs fine-color discrimination in bumblebees. **Science of The Total Environment**, Volume 857, Part 1, 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159298>.

IBGE. 2018. Pesquisa anual da indústria da construção. Rio de Janeiro. v.11. Acessado em: 21/05/2021, disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

ICMBio, 2023. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>. Acesso em: 04 de May. de 2023.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, A. O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alex. Med. J.** 54 (4), 287–293. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

International Agency for Research on Cancer Volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. IARC Working Group. Lyon; 3–10 March 2015. **IARC Monog Eval Carcinog Risk Chem Hum** (in press).

ISLAM, F.; WANG, J.; FAROOQ, M. A.; KHAN, M. S. S.; XU, L.; ZHU J.; ZHAO M.; MUÑOS S.; LI, Q. X.; ZHOU, W. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, Volume 111. Pages 332-351. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>.

IUCN 2022. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-1. <https://www.iucnredlist.org>.

KNAPP, R. A.; MATTHEWS, K. R. Non-Native Fish Introductions and the Decline of the Mountain Yellow-Legged Frog from within Protected Areas. **Conservation Biology**, 14: 428-438. 2000  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99099.x>.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1995 Nov 21;92(24):11049-52. doi: 10.1073/pnas.92.24.11049.

KNOZOWSKI, P.; GÓRSKI, A.; STAWICKA, A. M.; NOWAKOWSKI, J. J. Long-term changes in the diversity of amphibian communities inhabiting small water bodies in the urban area of Olsztyn (NE Poland). **The European Zoological Journal**, 89:1, 791-812. 2022. DOI: 10.1080/24750263.2022.2087773.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 139-146, ago. 2000. Disponível em: <http://www.rbherbicidas.com.br/index.php/rbh/article/view/328>. Acesso em: 28 jan. 2023.  
 doi:<https://doi.org/10.7824/rbh.v1i2.328>.

LAVILLA, E.; AQUINO, L.; KWET, A.; BALDO, D. *Hypsiboas faber*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2010**: e.T55479A11303155. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T55479A11303155.en>. Accessed on 07 November 2022.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.-G.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 464–478. 1990. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-h.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzym.** 57, 233–346. 1994. DOI: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; LOPEZ-TORRES, M.; PEREZ-CAMPO, R.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; BARJA, G. A comparative study of free radicals in vertebrates-2. Nonenzymatic antioxidants and oxidative stress. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol** 105: 757 – 763. 1993.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comp Biochem Physiol [B]** 144 (3):283-289. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>.

LUZA, A. L.; DA SILVA, E. R.; FAILACE, D. M.; Colombo, P. Nest site selection by *Hypsiboas faber* (Anura, Hylidae) in Southern Brazil. *Iheringia. Série Zoologia* [online]. 2015, v. 105, n. 4 [Accessed 13 November 2022], pp. 453-460. Available from: <https://doi.org/10.1590/1678-476620151054453460>.

MARQUES, M. N.; PASSOS, E. A.; DA SILVA, M. T. S.; CORREIA, F. O.; SANTOS, A. M. O.; GOMES, S. S.; ALVES, J. P. H. Determination of Glyphosate in Water Samples by IC. **Journal of Chromatographic Science**, Volume 47, Issue 9, Pages 822–824. October 2009. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.9.822>.

MARTINS, M.; HADDAD, C. F. B. Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hylafaber Wied* (Amphibia: Hylidae). **Amphibia-Reptilia**. v. 9. N. 1. p. 49-60, 1988. <https://doi.org/10.1163/156853888X00206>.

MCHENRY, L. B. The Monsanto Papers: Poisoning the scientific well. **Int J Risk Saf Med**. 2018;29(3-4):193-205. doi: 10.3233/JRS-180028.

MCMENAMIN, S. K.; HADLY, E. A.; WRIGHT, C. K. Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Nov 4;105(44):16988-93. doi: 10.1073/pnas.0809090105. Epub 2008 Oct 27.

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G.E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food Chem. Toxicol.**, 84, 133–153. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>.

MINGO, V.; LÖTTERS, S.; WAGNER, N. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles- A field study. **Sci Total Environ** 590-591, 114 – 124. 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.178.

MIKÓ, Z.; HETTYEY, A. Toxicity of POEA-containing glyphosate-based herbicides to amphibians is mainly due to the surfactant, not to the active ingredient. **Ecotoxicology** (2023). <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02626-x>.

MORAES, R. F. de. **Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Brasília, IPEA. 2016. Link: [https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td\\_2506.pdf](https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf).

MOUTINHO, M. F. **Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios**. 2013. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Biociências (IBIOC/SB) São Paulo.

MOUTINHO, M. F.; DE ALMEIDA, E. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A.; SCHIESARI, L. Herbicides employed in sugarcane plantations have lethal and sublethal effects to larval *Boana pardalis* (Amphibia, Hylidae). **Ecotoxicology**. 29, 1043–1051. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02226-z>.

MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environ Health** 15, 19. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.

NARAYANASAMY, S. K.; SIMPSON, D. V.; MARTIN, I.; GROTEWIEL, M; SCOTT, G. Paraquat exposure and Sod2 knockdown have dissimilar impacts on the *Drosophila melanogaster* carbonylated protein proteome. **Proteomics** 14: 2566 – 2577. 2014. doi: 10.1002/pmic.201400192.

NIU, Y.; CAO, W.; ZHAO, Y.; ZHAI, H.; ZHAO, Y.; TANG, X.; CHEN, Q. The levels of oxidative stress and antioxidant capacity in hibernating *Nanorana parkeri*. **Comp Biochem Physiol Part A Mol. Integr. Physiol.** 219-220: 19 – 27. 2018. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.02.003.

Os 10 ingredientes ativos mais vendidos. Brasília - DF 14/06/2021. Seção (se houver). Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2020/Os\\_10\\_IAs\\_vendidos\\_2020.xls](https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2020/Os_10_IAs_vendidos_2020.xls). Acesso em: 11/11/2022.

O'HANLON, S. J.; RIEUX, A.; FARRER, R. A. et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**. 2018 May 11;360(6389):621-627. doi: 10.1126/science.aar1965. doi: 10.1126/science.aar1965.

OMS/FAO. Pesticide residues in food – 2016: toxicological evaluations / Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, Geneva, Switzerland, 9–13 May 2016. 2017.

ORUÇ, E. Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environ Toxicol Pharmacol** 23:48–55. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.06.005>.

OWOLABI, O. D.; OMOTOSHO, J. S. Atrazine-mediated oxidative stress responses and lipid peroxidation in the tissues of *Clarias gariepinus*. **Iran J Toxicol** 11:29-38. 2017. doi: 10.29252/arakmu.11.2.29.

PARLAPIANO, I.; BIANCOLINO, F.; GRATAGLIANO, A.; RUSCITO, A.; LIBRALATO, G.; PRATO, E. Effects of commercial formulations of glyphosate on marine crustaceans and implications for risk assessment under temperature changes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 213, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112068>.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina, **Environmental Pollution**, V. 156, n. 1, p. 61-66, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>.

PERSCH, T. S. P.; WEIMER, R. N.; FREITAS, B. S.; OLIVEIRA, G. T. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. **Chemosphere** 174: 98 – 109. 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.092.

PIMENTA, B. V. S.; HADDAD, C. F. B.; NASCIMENTO, L. B.; CRUZ, C. A. G.; POMBAL, J. P. JR. 2005. Comment on “status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide”. **Science** 309(5743): 1999–1999. DOI: 10.1126/science.1112996.

REICHERT, L. M. M. (2021). Efeito dos herbicidas facet®, primoleo® e roundup® isolados e em mistura sobre índices de condição corporal e o sistema antioxidante de girinos de *Rhinella icterica*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, PUCRS, Brazil.

REICHERT, L. M. M.; DE OLIVEIRA, D. R.; PAPALEO, J. L.; VALGAS, A. A. N.; OLIVEIRA, G. T. Biochemical and body condition markers in *Rhinella icterica* tadpoles exposed to atrazine, glyphosate, and quinclorac based herbicides in ecologically relevant concentrations. **Environ Toxicol Pharmacol**. 2022 Jul; 93:103884. doi: 10.1016/j.etap.2022.103884. Epub 2022 May 13.

Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. Sistema Integrado de Gestão de Agrotóxicos. 2019.

ROSSATO, M. S. **Os climas do Rio Grande do Sul: variabilidade, tendências e tipologia**. 2011. 253p. Tese (Doutorado em geografia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RODRIGUES, M. A.; D'INCAO, F. Reproductive biology of the blue crab *Callinectes sapidus* on the Patos Lagoon estuary, RS, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 223-236, nov. 2014. Available at: <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/1036>.

SALATI, P. Aprovação de agrotóxicos no Brasil bate recorde anual desde 2016. G1, 06 fev. 2023. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2023/02/06/aprovacao-de-agrotoxicos-no-brasil-bate-recorde-anual-desde-2016.ghtml>. Acesso em: 17 mar. 2023.

SANTOS, E. P. Dinâmica de populações aplicada à pesca e piscicultura. SÃO PAULO, HUCITEC/EDUSP. 129P. 1978.

SANTOS, D. C. Estudo taxonômico de *Hypsiboas faber* (Wied-Neuwied, 1821) (Amphibia, Anura, Hylidae): integrando evidências. 2011. <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/12931>.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. *Conserv Biol* 21 (2): 465–471. 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00616.x>.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – Perfil das Cidades Gaúchas - São Francisco de Paula. Site Disponível em: [https://datasebrae.com.br/municipios/rs/Perfil\\_Cidades\\_Gauchas-Sao\\_Francisco\\_de\\_Paula.pdf](https://datasebrae.com.br/municipios/rs/Perfil_Cidades_Gauchas-Sao_Francisco_de_Paula.pdf). Acesso em: 31/05/2021.

SEGALLA, M.; BERNECK, B.; CANEDO, C.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARCIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LOURENÇO, A. C.; MANGIA, S.; MOTT, T.; NASCIMENTO, L. TOLEDO, L. F.; WERNECK, F.; LANGONE, J. A. List of all recognized species of amphibians, known by vouchers or published information to occur within the political borders of Brazil (as of March 2021). *Herpetologia Brasileira*, 10(1), 121–216. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4716176>.

SIDDIG, A. A. H.; ELLISON, A. M.; OCHS, A.; VILLAR-LEEMAN, C.; LAU, M. K. How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. *Ecological Indicators*, Volume 60, 2016. Pages 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>.

STADTMAN, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9: 315 – 325. 1990. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90006-5).

TAKADA, Y.; NOGUCHI, T. The degradation of urate in liver peroxisomes. Association of allantoinase with allantoinase in amphibian liver but not in fish and invertebrate liver. *J Biol Chem*. 1983 Apr 25;258(8):4762-4. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32489-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32489-X).

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Anal Biochem* 11:256–265 (1965). DOI: 10.1016/0003-2697(65)90013-8.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Conceitos e aplicações dos adjuvantes. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 10 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 56). Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do56.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do56.htm).

VENTURINO, A.; ROSENBAUM, E.; CABALLERO DE CASTRO, A.; ANGUIANO, O. L.; GAUNA, L.; FONOVICH DE SCHROEDER, T.; PECHEN DE D'ANGELO, A. M. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*. May-Aug;8(3-4):167-86. 2003. doi: 10.1080/1354700031000120116.

WAGNER, N.; REICHENBECHER, W.; TEICHMANN, H.; TAPPESER, B.; LÖTTERS, S. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. *Environ Toxicol Chem*, 32: 1688-1700. 2013. <https://doi.org/10.1002/etc.2268>.

WELLS, K. D. The social behavior of anuran amphibians. **Anim. Behav.** 25, 666–693. 1977. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(77\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-3472(77)90118-X).

WINGEN, N. M. de A.; CUBAS, G. K.; OLIVEIRA, G. T. A preliminary approach to the Impact of a commercial formulation of glyphosate (Roundup®) in ecologically relevant concentrations on *Pseudis minuta* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**. Vol. 17 No. 1. 2022. DOI: <https://doi.org/10.5132/eec.2022.01.07>.

WILKENS, A. L. L.; VALGAS, A. A. N.; OLIVEIRA, G. T. Effects of ecologically relevant concentrations of Boral® 500 SC, Glifosato® Biocarb, and a blend of both herbicides on markers of metabolism, stress, and nutritional condition factors in bullfrog tadpoles. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 26, 23242–23256. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05533-z>.

WILLIAMS, B. K; SEMLITSCH, R. D. Larval responses of three midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. **Arch Environ Contam Toxicol** 58:819–827. 2010. DOI: 10.1007/s00244-009-9390-z.

WOMACK, M. C., BELL, R. C. Two-hundred million years of anuran body-size evolution in relation to geography, ecology and life history. **J Evol Biol.** 2020; 33: 1417– 1432. <https://doi.org/10.1111/jeb.13679>.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo  
Porto Alegre – RS – Brasil  
Fone: (51) 3320-3513  
E-mail: [propesq@pucrs.br](mailto:propesq@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)