

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

JESSICA FONSECA DE ARAUJO

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS LIGADOS AO METABOLISMO E AO ESTRESSE EM
SALVATOR MERIANAE: UMA RELAÇÃO COM O USO DE AGROTÓXICOS**

Porto Alegre
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

BIOMARCADORES SANGUÍNEOS LIGADOS AO METABOLISMO E AO
ESTRESSE EM *SALVATOR MERIANAE*: UMA RELAÇÃO COM O USO DE
AGROTÓXICOS

Jessica Fonseca de Araujo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 – Caixa Postal 1429
Fone: (51) 320-3500
CEP 90619-900 Porto Alegre - RS
Brasil

2020

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS LIGADOS AO METABOLISMO E AO
ESTRESSE EM SALVATOR MERIANAE: UMA RELAÇÃO COM O USO DE
AGROTÓXICOS**

Jessica Fonseca de Araujo

Orientador: Dr. Guendalina Turcaro Oliveira

Co-orientadora: Dr. Laura Verrastro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2020

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	viii
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	xx
2.1. Licenças.....	xx
2.2 Área de Estudo.....	xx
2.3. Captura dos animais.....	xxiii
2.4 Medidas Corporais.....	xxiv
2.5. Marcadores de função hepática.....	xxv
2.6. Marcadores de metabolismo intermediário e endócrino.....	xxv
2.7. Balanço Oxidativo.....	xxvii
2.8. Análise Estatística.....	xxviii
3. RESULTADO.....	xxviii
3.1. Medidas Corporais.....	xxviii
3.2. Marcadores de função hepática.....	xxx
3.3. Marcadores de metabolismo intermediário e endócrino.....	xxxiii
3.4. Balanço Oxidativo.....	xxxvii
4. DISCUSSÃO.....	xlii
4.1. Medidas Corporais.....	xlii
4.2. Marcadores de função hepática.....	xliii
4.3 Marcadores de metabolismo intermediário e endócrino.....	xliv
4.4. Balanço Oxidativo.....	xlvii
4. CONCLUSÃO.....	l
REFERÊNCIAS.....	liii
APÊNDICE.....	lxi

AGRADECIMENTOS

Eu queria agradecer a todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes comigo em toda a trajetória do mestrado, o que não foram poucas. Muita gratidão a todos vocês. Eu não podia ir a campo sozinha, pois precisava de alguém que me ajudasse a segurar o lagarto enquanto tirava sangue, mas não tinha problema, porque todos estavam lá. Meus amigos do laboratório, como o Diogo que sempre me socorria quando pegávamos um bicho feroz e adulto, o Daniel e o seu pai, o Gustavo, o Artur, o Eduardo (que nem biólogo é, mas estava lá), meu namorado Dani (advogado, nada a ver com o assunto, mas foi me ajudar também e ainda segurou o bicho) e meu pai, minha mãe e meu irmão que eram surpreendidos a cada vez que o dia amanhecia com sol e precisava deles para ir a campo inesperadamente. Além do Arthur Schram que foi quem me ensinou as técnicas para lidar com esse bichinho delicado. Além, é claro, das tias da cozinha da EEA, com suas comidas deliciosas, o prof. Rafael que me ajudou com tudo que precisei na EEA, e o seu Aldair, que lida com apicultura, mas até lagarto pegou, várias vezes por sinal, além de ajudar com seu caminhão carregando armadilhas, o que nem era sua obrigação.

Aí chegaram os dias das bancadas. O que seria de mim sem o Artur e a Nati que sempre estavam lá me ajudando ou me apoiando quando tudo dava errado. O que falar da prof. Guenda, estava sempre ali, nem que fosse por ligação, mensagem, vídeo-chamada, mas ela estava ali, SEMPRE. E como eu a incomodei com as minhas trapalhadas. Conseguimos chegar ao fim, pelo menos do mestrado!

Gratidão também a todos os meus AMIGOS do laboratório por todas as palavras positivas e de apoio quando eu achava que estava dando tudo errado, foi muito importante pra mim!

E mais uma vez gratidão ao meu pai, minha mãe, meu irmão e meu namorado Dani por terem me apoiado e me aguentado em todas essas etapas, não foi fácil, eu sei. Sem vocês eu realmente não conseguiria. Agradeço também a todas as pessoas que viam um teiú e vinha me avisar, mesmo que eu não fosse coletar. E é claro, agradeço ao *S. merianae* por essa parceria, mesmo sendo um bichinho rebelde. Até que sentirei saudades. E por fim, ao CNPQ, por ter me possibilitado fazer o mestrado. Fim.

RESUMO

O uso de agrotóxicos começou a ser disseminado na década de 60 com a Revolução Verde. Entretanto, não se sabia quais seriam as consequências desse uso em longo prazo. Ao ser aplicado, resíduos de agrotóxico acabam atingindo animais não-alvo, se infiltrando no solo e atingindo a água. Como consequência, os agrotóxicos podem bioacumular e/ou impactar organismos não-alvo causando danos bioquímicos e fisiológicos antes mesmo de alterações morfológicas visíveis. Quando se trata de ecotoxicidade, os répteis são os animais menos estudados e encontram-se atualmente em declínio global devido, principalmente, a degradação do hábitat ao qual ocupam. O lagarto *Salvator merianae* tem ampla distribuição na América do Sul e é encontrado frequentemente em áreas de cultivo agrícola, além de seu período reprodutivo coincidir com a aplicação de agrotóxico nas culturas de primavera/verão. Os objetivos deste estudo foram comparar possíveis alterações em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *S. merianae* coletados em uma área exposta a agrotóxicos e uma área de referência. Para tal, quantificamos diferentes marcadores sanguíneos: albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transpeptidase (GGT), glicose sérica (GLI), proteínas totais (Pt), ácido úrico (AU), triglicerídeos (TGL), VLDL, corticosterona, TBARS, glutathione-S-transferase (GST), e da atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Para isso, foram coletadas amostras de sangue de 28 lagartos da espécie *S. merianae* na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, no ano de 2019 e 2020, e fora do período de hibernação. Foi utilizado plasma para quantificarmos os marcadores de dano hepático, metabolismo intermediário e endócrino através de kits comerciais da BioTécnica, e para as análises de estresse oxidativo utilizamos eritrócitos sendo estes quantificados através de métodos espectrofotométricos padronizados para lagartos em nosso laboratório. Os resultados diferiram significativamente quanto aos níveis de TBARS, GST, TGL, VLDL, AU quando comparamos os juvenis coletados em área exposta com aqueles de área referência; já para as fêmeas observamos diferenças para os níveis de SOD e PT, e para os machos para a SOD, CAT e GST. Os resultados relacionados ao dano hepático e aos níveis de corticosterona não foram significativos para nenhuma das categorias etárias (juvenis fêmeas e machos). Assim, conclui-se que o contato com agrotóxicos está tendo um impacto sobre *S. merianae*, principalmente para os juvenis o que pode trazer consequências negativas para as próximas gerações podendo conduzir a um impacto nesta população. Além disto, este conjunto de resultados nos permite sugerir o uso destes marcadores para o acompanhamento da saúde destes animais em longo prazo.

Palavras-chave: Répteis, lagartos, toxicologia, fisiologia, estresse oxidativo, metabolismo.

ABSTRACT

The use of pesticides began to be widespread in the 60s, originated in the Green Revolution. However, we didn't know about the consequences of this long-term. When applied, the pesticide residues influenced non-target animals, infiltrating the soil and contaminating the water. As a consequence, agrochemicals are bioaccumulating and/or impact not-target organisms causing biochemical and physiological damage before visible morphological changes. When it's about ecotoxicity, the reptiles are the least studied animals and are currently in global decline, mainly due to a degradation of the habitat to which it is by anthropic action. The *Salvator Merianae* lizard has a wide distribution in South America and is found frequently in agricultural cultivation areas, beside to the reproductive period coinciding with the application of the pesticide in the culture os spring, summer. Therefore, the objectives of this study are to compare possible to change the biochemical and physiological parameters of *S. merianae* in an area exposed to agrochemicals and to a reference area in blood biomarkers album (ALB), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (FAL), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), serum glucose (GLI), total proteins (Pt), uric acid (AU), triglycerides (TGL), VLDL and corticosterone (COR), TBARS, glutathione-S-transferase (GST) and activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). For that, blood samples were collected from 28 lizards of the species *S. merianae* at the Experimental Agronomic Station of UFRGS in 2019 and 2020 in outside of hibernation periods. Plasma was used to quantify the markers for liver damage, the intermediate and endocrine metabolism were performed using kits from BioTécnica and the analyzes of oxidative stress in erythrocytes through spectrophotometer standardized to lizards in our laboratory. The results differed significantly for young lizards in the levels of TBARS, GST, TGL, VLDL, AU; about the female differed in SOD and PT and males in SOD, CAT and GST. The results of liver damage and corticosterone levels were not significant for any categories (juvenile, children and male). Thus, it is concluded that the contact with agrochemicals is causing a harmful effect on *S. merianae*, mainly when treating juveniles, it's can cause negative consequences for the next interviews may lead to na impacto n this population. Besides that, this set of results allows us to suggest the use of these markers to monitor the health of these animals in the long term.

Keywords: Reptiles, lizards, toxicology, physiology, oxidative stress, metabolism.

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos começaram a ser disseminados na segunda guerra mundial, onde o DDT (Dicloro difenil tricloroetano) foi utilizado como medida de prevenção ao tifo em soldados e posteriormente foi usado como pesticida (D'amato *et al.*, 2002). Assim, com o intuito de diminuir a fome do mundo, entre as décadas de 60 e 70, surgiu a chamada “Revolução Verde” que tinha como objetivo aumentar a produtividade agrícola através do uso de novas tecnologias entre elas o aumento do uso de agrotóxicos, obtendo apoio de diversas instituições. Neste período, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e o Banco Mundial fomentaram fortemente o uso destes agrotóxicos e de insumos agrícolas (Costa e Pires, 2016).

Na década de 70, as primeiras grandes empresas fabricantes de insumos agrícolas começaram a se estabelecer no mercado brasileiro, o que colocou o Brasil como um dos maiores consumidores desde então (Terra; Pelaez, 2009 apud Fassis,F.;2014). Porém, desde 1946 já havia alguma produção de agrotóxicos como o BHC, Parathion e DDT (Costa e Pires, 2016).

Com o aumento da produção dos agrotóxicos, começaram a surgir atualizações na legislação e organizações. Em 1965, foi criado o Sistema Nacional de Crédito Rural, que consiste em oferecer financiamento ao produtor rural para compras de insumos agrícolas (Costa and Pires, 2016).

Nesse contexto o Banco do Brasil exigia que 15% desse crédito fossem destinados para compra de agrotóxicos (Antenor, F.; 1986, p. 26 apud Costa e Pires, 2016). Juntamente, a Lei nº 10.925/04 que “reduz as alíquotas do PIS/PASEP e da COFINS incidentes na importação e na comercialização do mercado interno de fertilizantes e defensivos agropecuários e dá outras providências”, a qual está vigente até os dias atuais, viriam a incentivar ainda mais esse uso.

Também entrou em vigor a Lei dos Agrotóxicos nº 7.802 de 11 de julho de 1989, na qual o artigo 2º define agrotóxico como (Brasil, 1989):

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Esta se encontra em análise para atualizações através do Projeto de Lei nº6299/02, o qual propõe mudanças como a troca do nome para pesticida, a possibilidade de permitir o uso dessas substâncias antes do término da análise de risco do produto e registro somente do nome do princípio ativo do agrotóxico (Haddad *et al.*, 2019).

As regiões brasileiras onde têm predomínio do uso de agrotóxicos são sudeste, sul e centro-oeste; e as culturas agrícolas que mais utilizam agrotóxicos são a de soja, milho, citros e cana-de-açúcar (São Paulo, 2004). Segundo Coutinho *et al.* (2005), os agrotóxicos mais utilizados nessas culturas são os aminoácidos fosfonados composto principalmente pelo glifosato; as benzenaminas onde podemos destacar fenilaminas, fenilenodiaminas, pendimetalina e dinitroanilinas; o grupo das triazinas o qual pertence a atriazina; os organofosforados tendo como destaque o fenitrothion; e por fim os fenilpirazóis com o químico fipronil. Destes, pode-se destacar o glifosato que está em processo de proibição em países como a Alemanha pelo impacto causado na polinização e possível teor cancerígeno, e a atrazina que está banida há mais de dez anos na União Europeia por causar contaminação em águas subterrâneas (Bombardi, 2017; Folha de São Paulo, 2019).

Em 2008, o Brasil recebeu o título de maior consumidor de agrotóxico, caracterizado pela utilização de grande quantidade desses insumos em pedaços concentrados de terra (Serra *et al.*, 2016). O uso excessivo e crescente de agrotóxicos tem causado uma acumulação de resíduos nos alimentos acima dos níveis permitidos, o que tem sido motivo de constante preocupação (Brusamarelo *et al.*, 2018). Ainda assim, em 2019, houve um total de 474 produtos novos registrados no país, sendo vários deles proibidos em outros países como Austrália, Índia, Canadá e União Europeia (Folha de São Paulo, 2019). Apesar de toda a produção de agrotóxicos ter sido incentivada para combater a fome, até os dias atuais ainda não houve reduções significativas para tal, fazendo que organizações, como a FAO, que antes apoiavam o uso se mostrem não favoráveis atualmente (Costa e Pires, 2016).

Para uma maior segurança e devido ao fato de que existem aproximadamente 300 mil princípios ativos, os pesticidas são classificados de acordo com sua toxicidade, grupo químico e ação em organismos-alvo (Almeida, 2009). Os inseticidas, que têm como organismos-alvo os insetos, pertencem aos grupos químicos organofosforados, carbamatos e organoclorados; os fungicidas de combate a fungos são os Etileno-bis-ditiocarbamatos,

Trifenilestânico, Captan, Hexaclorobenzeno, Em relação aos herbicidas, estes têm como principais grupos Paraquat, Glifosato, Pentaclorofenol, Derivados do ácido fenoxiacético, Dinitrofenóis (Almeida, 2009).

Já a toxicidade, é medida através da Dose Média Letal (DL50) que seria a dose necessária para matar 50% dos animais de teste (Barrigosi, 2018). Entretanto, apesar de ser aplicada a dosagem mínima e de proteger as culturas agrícolas de pragas e agentes patológicos, estes ainda assim podem causar danos não só à saúde humana, mas também a organismos não-alvo e ao meio ambiente em geral (Spadotto, 2006) (Fig.1). Além disso, os testes sobre a toxicidade são feitos em determinados animais, geralmente ratos, o que acaba dificultando o conhecimento sobre como esses compostos realmente impactariam outros organismos que não os de teste. Também deve ser ressaltado que na ecotoxicidade, diferentes organismos podem ter diferentes reações aos pesticidas, o que pode fazer com que uma dose tolerada por um organismo seja letal para outro, mesmo nas quantidades sugeridas para aplicação (Brusamarelo, 2018)

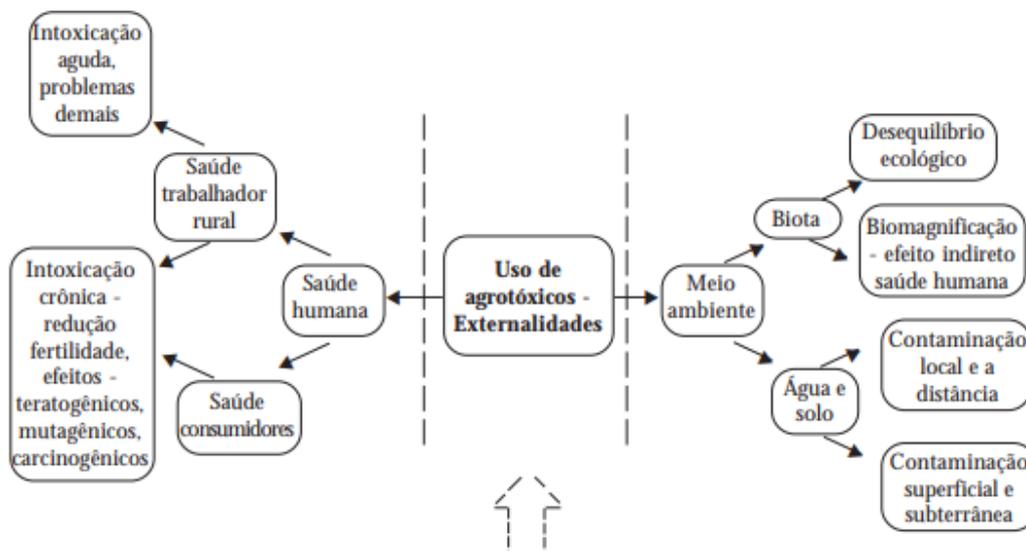


Figura 1: Efeitos dos agrotóxicos na saúde humana e no meio ambiente. Fonte: Soares e Porto (2007)

Ademais, as pragas mais resistentes geneticamente aos agrotóxicos resultam por sobreviver e se reproduzir originando uma população mais tolerante aos efeitos dos agrotóxicos. Somado a isso, pode haver a eliminação dos predadores naturais das pragas, os quais seriam responsáveis por regular o tamanho populacional normal destes organismos no ecossistema. Como consequência, pode ocorrer um aumento da população das pragas, com organismos mais resistentes, tendo a necessidade de aumentar o número e a quantidade de

pesticidas utilizados (Soares e Porto, 2007). Tal fato já havia sido relatado por Rachel Carson no livro *Primavera Silenciosa*, a qual dizia que (1969, p.20) “Assim o Homem desfaz os controles e equilíbrios intrínsecos, por meio dos quais a Natureza mantém as espécies dentro de determinados limites”.

Os agrotóxicos podem ser aplicados em forma gasosa, sólida ou líquida que é a mais frequente (Brusamarelo *et al.*, 2018). Neste, o composto é misturado com água formando uma calda que será posteriormente pulverizada em cultivos agrícolas (Brusamarelo *et al.*, 2018). Contudo, segundo Spadotto (2006), existe uma perda dos pesticidas que são pulverizados, podendo atingir organismos não alvos sendo uma fonte de contaminação ambiental em potencial (Spadotto, 2006).

Assim, o uso frequente de agrotóxicos pode causar contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas indo parar em locais distantes de áreas agrícolas (Spadotto, 2006). Uma vez em contato com a água, seus resíduos podem se ligar em materiais particulados em suspensão ou serem absorvidos por algum organismo vivo podendo ter um efeito tóxico e acumulativo (Copatti *et al.*, 2009), o que pode ter como consequência a alteração de toda uma cadeia alimentar através da pressão de seleção em organismos, que resulta em mudanças no funcionamento do ecossistema (Spadotto, 2006).

Como resultado, o contato com contaminantes podem acarretar em alterações bioquímicas e fisiológicas de organismos (Clementes, 2000) e essas mudanças terão como consequência um maior gasto de energia na tentativa de biotransformar estes agrotóxicos (Dornelles *et al.*, 2014). Os chamados *trade-offs* são caracterizados pela alocação de recursos em detrimento a limitações por fatores negativos (Monaghan; Metcalfe; Torres, 2009). O uso de reservas energéticas para suprir danos de impactos ambientais pode prejudicar o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento dos animais devido a uma menor alocação de energia para esses processos (Oliveira *et al.*, 2018).

Segundo Artacho *et al.* (2007), as adaptações fisiológicas ocasionadas devido as mudanças ambientais antrópicas podem ser medidas através de técnicas de bioquímica sanguínea, já que metabólitos plasmáticos refletiriam o estado fisiológico do animal e ainda tem como vantagem a não necessidade de matá-los. Logo, estudos com esses parâmetros podem ser usados para comparar áreas de referências com áreas expostas a contaminantes.

O termo “biomarcador” já recebeu várias definições, sendo geralmente usado com o objetivo de incluir qualquer mensuração que reflita a interação entre um sistema biológico e

um risco potencial, o qual pode ser químico, físico ou biológico (Ron Van Der Oost, Beyer, & Vermeulen, 2003). Peakall (1994) definiu biomarcador como sendo uma mudança na resposta biológica, desde níveis moleculares, passando pelo nível celular e fisiológico até mudanças comportamentais, que pode ser relacionada à exposição a um determinado ambiente contaminado. Em geral, alterações decorrentes da exposição a um poluente apresentam maior frequência em nível celular do que em níveis de alta organização biológica, como reprodutivos e comportamentais (Ron Van Der Oost *et al.*, 2003). Heath (1995) sugere que quando investigações sobre o efeito de um poluente sobre peixes, ou outros organismos, forem realizadas, deve-se focar no espectro de complexidade biológica, como demonstrado na figura abaixo (Fig. 2).

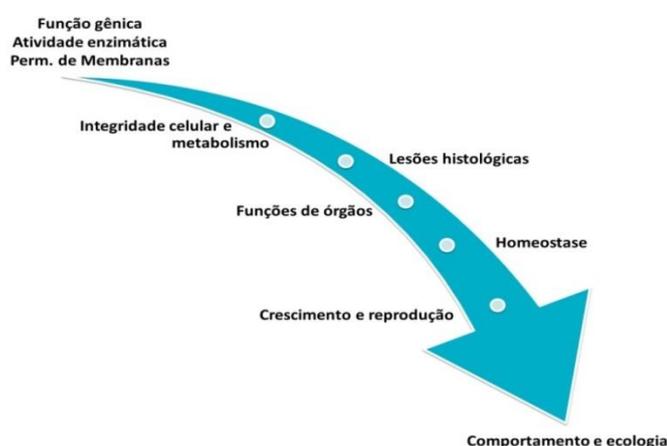


Figura 2. Espectro de complexidade biológica no estudo do efeito de qualquer fator ambiental, incluindo poluição (adaptado de Heath, 1995)

Neste trabalho, utilizaremos marcadores ligados ao metabolismo, a função hepática, endócrina e ao balanço oxidativo sanguíneo. A maioria dos pesticidas causa reações metabólicas e a hepatotoxicidade pode ser um dos primeiros efeitos tóxicos (Hernández *et al.*, 2013). Contudo, o uso de marcadores ligados ao metabolismo intermediário e ao sistema endócrino para testes toxicológicos e/ou como marcadores de alterações ambientais ainda é muito restrito.

Existem alguns trabalhos em lagartos que abordam parâmetros do metabolismo intermediário, como níveis de glicose, lipídios, triglicerídeos, proteínas e ácido úrico, associados ao ciclo circadiano e à sazonalidade, estabelecendo conexões entre o ciclo de vida da espécie em estudo com variáveis ambientais, como a temperatura e o fotoperíodo

(Bennett and Dawson, 1976; Gilles e Cruz, 1981; Southwood *et al.*, 2006; Williard and Harden, 2011; Oliveira *et al.* 2018). Os níveis e estratégias de alocação destes recursos energéticos têm um papel importante na reprodução, no crescimento e na capacidade de sobrevivência dos animais.

A glicose ocupa uma posição central no metabolismo de plantas, animais e muitos microorganismos; sendo relativamente rica em energia potencial atuando como um bom combustível para o organismo. A glicose pode ser armazenada na forma de um polímero de alta massa molecular (glicogênio), onde a célula pode estocar grandes quantidades desta hexose. Quando a demanda de energia aumenta, a glicose é liberada destes polímeros de armazenamento intracelulares e utilizada para produzir ATP, de maneira anaeróbia ou aeróbia (Nelson e Cox, 2014). A glicose também é uma molécula precursora extremamente versátil, capaz de suprir uma enorme variedade de intermediários metabólicos em reações biossintéticas.

O estudo de lipídios também é relevante em trabalhos acerca do metabolismo intermediário, uma vez que tais compostos são fundamentais na estruturação e manutenção da integridade fisiológica de membranas celulares, além de apresentarem um papel no transporte de substratos através do sistema circulatório tanto de invertebrados como vertebrados (O'Connor e Gilbert 1968). Este fato os torna bons marcadores, pois o contato com contaminantes altera a estrutura química e celular dos triglicerídeos, o que acaba ocasionando uma diminuição das reservas energéticas do animal, essencial para a sobrevivência (G.El-Banna *et al.*, 2009).

A quantidade de proteínas totais também pode ser alterada com a exposição a contaminantes como os agrotóxicos, isso porque ocorre aumento da proteólise com a finalidade de suprir as alterações metabólicas ocorridas (Ganeshwade, 2012). A albumina é a proteína mais abundante no plasma e pode-se encontrar alterada caso haja dano hepático, já que a mesma é sintetizada principalmente pelo fígado, um decréscimo nos seus níveis pode acontecer devido à anorexia e a elevação devido a danos hepáticos, desidratação e vitelogenese (Divers; Cooper, 2000). O ácido úrico é a principal excreta nitrogenado dos répteis, é considerado produto do metabolismo intermediário refletindo um equilíbrio entre as vias desse sistema além de atuar como uma molécula antioxidante (Oliveira *et al.*, 2018).

O fígado desempenha inúmeras funções, não obstante ele seja, igualmente, um órgão discreto com muitas de suas funções se relacionando reciprocamente, possui uma elevada

taxa metabólica, sintetizando e processando múltiplas substâncias que são transportadas para outras áreas do corpo. Quase toda a síntese de lipídios a partir dos carboidratos e proteínas ocorre no fígado. A função do fígado nos répteis varia de acordo com a idade e maturação reprodutiva, mas são basicamente metabolismo de glicogênio, produção de ácido úrico, proteínas e reservas de gordura, sendo estas maiores em fêmeas que em machos (Divers *et al.*, 2000).

Além disso, a biotransformação de diversas substâncias exógenas e endógenas como, por exemplo, diversos hormônios secretados pelas glândulas endócrinas que são quimicamente alterados ou excretados pelo fígado, incluindo a tiroxina, o cortisol, entre outros. A lesão hepática pode levar ao excesso de acúmulo de um ou mais hormônios, provocando uma hiperatividade dos sistemas hormonais, e assim, alterando o desenvolvimento, padrões de crescimento e reprodutivo (Guyton, 2006; Moyes e Schulte, 2010). No geral, é no fígado que os xenobióticos, como os agrotóxicos, são metabolizados; sendo o mesmo, responsável pela regulação da glicose que pode ter suas concentrações alteradas ao entrar em contato com um contaminante (Keller *et al.*, 2004).

A enzima Gama GT, é encontrada primariamente no sistema hepatobiliar, alterações em sua atividade levam a mudanças na atividade de fosfatase alcalina e transaminases, o que faz que para um diagnóstico de dano hepático estas sejam analisadas conjuntamente. A alanina aminotransferase é uma que enzima que tem como função catalisar a reação de transaminação reversível de alanina e 2-cetoglutarato em piruvato e glutamato utilizando como cofator o piridoxal-fosfato (Batista, 2016). Não é caracterizada por ser uma enzima estritamente hepatoespecífica, tendo em vista que a mesma também é encontrada na massa muscular esquelética estriada e cardíaca, além de rins e eritrócitos (Batista, 2016).

Batista (2016) relata que em cães e gatos, os quais possuem maiores quantidades desta enzima que outras espécies, podem ter a lesão hepatocelular induzida, além da liberação de ALT na corrente sanguínea por transtornos como hipóxia, acúmulo de lipídeos hepáticos, doenças bacterianas e virais, inflamações, neoplasias hepáticas, endo e exotoxinas e medicamentos. Hernández *et al.* (2013) também mostrou que níveis de ALT se mostraram elevados em trabalhadores rurais expostos a pesticidas, o que pode ser considerado uma exotoxina por exemplo.

Após ocorrer a lesão hepática, a ALT tem seus níveis aumentados com o pico de liberação após 3 a 4 dias e o retorno basal ocorre em até 14 dias (Gonzalez e Silva, 2006). A

meia vida da ALT varia de acordo com o organismo, sendo de 17 a 60 horas em cães, de 3,5 horas em gatos, além de poder ter seu aumento imperceptível em animais com lesões crônicas (Thrall *et al.*, 2015).

A fosfatase alcalina (FAL) tem como função catalisar a hidrólise de ésteres do ácido fosfórico, mas apesar de sua maior quantidade de origem sérica ser encontrada no fígado, assim como a ALT, não é uma enzima hepatoespecífica e pode ser encontrada em outros tecidos também com concentrações elevadas sendo eles rins e intestino (Gonzalez e Silva, 2006).

Ao longo dos anos têm aumentado a preocupação com os efeitos químicos da desregulação endócrina causada por contaminantes, entre estes os agrotóxicos, o que conduziu à comunidade científica a busca por modelos de vertebrados apropriados para avaliação de risco, tornando-se isto uma prioridade. Além disso, o estresse fisiológico pode provocar a secreção de glicocorticoides em vertebrados (Meylan *et al.*, 2010) onde a corticosterona, principal glicocorticóide em répteis, causa um desequilíbrio imunológico (Mcewen *et al.*, 1997); ajustes metabólicos que podem conduzir a um aumento da glicemia por inibir a captação de glicose nos tecidos periféricos e/ou aumentar a síntese deste monossacarídeo pela gliconeogênese hepática, a mobilização das reservas lipídicas e protéicas (Wilkins; Valgas; Oliveira, 2019), e modulação de pró e antioxidantes, podendo conduzir a um aumento da formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO) com consequente incremento da lipoperoxidação (Lin *et al.*, 2004; Betteridge, 2000).

Parâmetros ligados ao status oxidativo dos animais têm sido muito utilizados em pesquisas de biomonitoramento em ambiente aquático e terrestre, principalmente com peixes e abelhas, mas ainda são escassos os estudos utilizando lagartos, principalmente de espécies nativas, do Brasil. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas derivadas do oxigênio molecular (O₂) que participam de alguns processos fisiológicos importantes como fertilização, bioluminescência ou produção de toxinas de defesa, sendo produzidas naturalmente pelos organismos aeróbios assim como induzidas por desequilíbrios fisiológicos (patologias) como também, por alterações ambientais. Por outro lado, as EROs podem ser altamente nocivas devido à sua capacidade de oxidar lipídios de membrana, proteínas e DNA (Betteridge 2000; Halliwell & Gutteridge, 2007; Bonzini *et al.*, 2008; Pašková *et al.*, 2011;). Assim, daremos ênfase à quantificação dos produtos da oxidação de lipídios ou lipoperoxidação, através da quantificação do TBARS.

Quando existe um incremento na formação de EROs sem sua devida metabolização pelo sistema antioxidante (enzimático e não enzimático) pode ocorrer o que chamamos de estresse oxidativo (Reguera *et al.*, 2015); assim, estas moléculas pró-oxidantes (EROs) podem oxidar substratos endógenos como o DNA, as proteínas e os lipídios (Zhang *et al.*, 2015). Dentre as defesas antioxidantes enzimáticas mais estudadas temos a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion superóxido à peróxido de hidrogênio e oxigênio, e a catalase (CAT) que remove o peróxido de hidrogênio quando presente em altas concentrações, além da glutathione peroxidase que metaboliza tanto peróxidos orgânicos como inorgânicos (Betteridge, 2000). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem várias substâncias de baixa massa molecular de natureza lipofílica, como a vitamina E, o beta caroteno, os estrógenos; ou de antioxidantes de natureza hidrossolúvel, como a glutathione, o ascorbico e o ácido úrico que interrompem a propagação de reações auto-catalíticas causadas pelos radicais ou espécies reativas (Zanette *et al.*, 2015).

Dentre as enzimas de biotransformação que atuam em rotas de excreção de substâncias endo e xenobióticas e, protegem as células contra toxicidade química e estresse, mantendo a homeostase celular, pode-se destacar as glutathione S-transferases (GSTs). Esta família multifuncional de enzimas atua catalisando a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas; assim, as GSTs desempenham vários papéis fisiológicos, tais como sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteróides, heme, bilirubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (Freitas *et al.*, 2008). A glutathione-S-transferase, esta pode ter sua atividade alterada frente a um estressor, como foi visto em girinos de rã touro por Wilkens *et al.* (Wilkens; Valgas; Oliveira, 2019).

Apesar de os parâmetros bioquímicos sanguíneos serem usados com frequência para avaliar a saúde de animais, em répteis ainda é muito pouco conhecido (Viana *et al.*, 2014). Em uma revisão feita por Hopkins (2000), foi visto que em um período de dez anos, entre todos os artigos publicados de vertebrados sobre ecotoxicologia, o que menos havia publicação era o dos répteis (Quadro 1).

Quadro 1: Número de artigos publicados de vertebrados sobre ecotoxicologia do ano de 1990 a 1999. Número em parênteses se trata de revisões. Tirado de Hopkins (2000).

Ano	Pássaros	Mamíferos	Peixe	Anfíbios	Répteis
1990	16 (24)	3 (5)	45 (68)	2 (3)	1 (2)
1991	15 (24)	12 (19)	38 (60)	1 (2)	0 (0)
1992	13 (19)	8 (12)	52 (78)	2 (3)	0 (0)
1993	22 (30)	9 (12)	44 (60)	3 (4)	1 (1)
1994	23 (25)	16 (17)	52 (57)	7 (8)	0 (0)
1995	19 (19)	10 (10)	60 (60)	6 (6)	2 (2)
1996	22 (25)	10 (11)	57 (64)	3 (3)	0 (0)
1997	26 (21)	12 (10)	80 (66)	8 (7)	3 (2)
1998	36 (29)	13 (10)	69 (56)	15 (12)	4 (3) ^b
1999	28 (20)	18 (13)	81 (59)	16 (12)	1 (1)
Totais	220 (24)	111 (12)	578 (62)	63 (7)	12 (1)

Nos últimos anos, a população de répteis vem sofrendo um declínio global (Sousa *et al.*, 2010). Os habitats destes animais, com frequência, se encontram em locais de áreas agrícolas (Wagner *et al.*, 2015), sendo assim um dos possíveis fatores que pode estar contribuindo para esta diminuição é o contato com pesticidas (Weir *et al.*, 2015). Além disso, o fato de os répteis serem sensíveis às mudanças ambientais faz com que estudos como este sejam importantes para que possam servir como bioindicadores (Raphael *et al.*, 1994). Muitos répteis são predadores de topo de cadeia, possuem alta longevidade e o fato de terem uma área de vida curta fazem com que esses animais sejam essenciais em estudos com contaminantes e bioacumulação (Hopkins, 2009).

A família Teiide é caracterizada por possuir espécies com grandes e regulares escamas na cabeça e a língua bífida (Vitt *et al.*, 2008). Estudos recentes comprovaram divergência de espécies dentro do gênero *Tupinambis* o que resultou em outros dois: *Tubinambis* e *Salvator* (Harvey *et al.*, 2012), sendo este último foco do estudo presente. A espécie *Salvator merianae* (Fig. 3) tem uma ampla distribuição na América do Sul e é considerada a maior espécie em tamanho dessa região, podendo alcançar até 500 mm de comprimento (Winck, 2007).



Figura 3: Indivíduo de *Salvator merianae*. Fonte: Vieira (2016, p.55)

É uma espécie diurna com picos de atividades entre o meio dia e o meio da tarde (Hatano *et al.*, 2001). Costuma ter um período de hibernação que vai de abril a setembro e uma alimentação onívora e oportunista (Kiefer *et al.*, 2000). A área de vida varia de acordo com a idade de maturação, sendo os juvenis de 0,211 ha, fêmeas com $0,298 \pm 0,655$ ha e machos $3,32 \pm 5,87$ ha (Vieira, 2016).

O lagarto *Salvator merianae*, popularmente conhecido como Teiú, está presente em áreas expostas a contaminantes como em cultivos agrícolas o que o torna uma espécie com potencial bioindicador em áreas de utilização de agrotóxicos (Schaumburg *et al.*, 2016). Ademais, no Brasil a aplicação de agrotóxicos é realizada no período de primavera e verão que são as estações reprodutivas do *Salvator merianae* (Schaumburg *et al.*, 2016) e segundo Russel *et al.*, juvenis de répteis seriam mais vulneráveis que os adultos ao se tratar de toxicidade de contaminantes (Russel *et al.*, 1999).

Além de serem considerados sensíveis a alterações ambientais o que tem como consequência mudanças fisiológicas, a *S. merianae* possui ovos de casca flexível para a absorção de água durante a incubação o que pode permitir que sejam expostos a compostos como pesticidas (Schaumburg *et al.*, 2016). Eisenreich *et al.* (2012) relata também uma transferência de contaminantes maternos para os ovos em répteis, e os ovos eclodidos que

tiveram em contato com estes contaminantes apresentaram aumento de mortalidade além de deformidades em juvenis.

A reprodução de *Salvator merianae*, assim como de *Tupinambis rufescens*, é caracterizada por ter somente uma oviposição no ano variando entre 20 a 50 ovos dependendo do tamanho da fêmea e uma incubação de 65 a 75 dias (Chamut *et al.*, 2012). Entretanto, nem todas as fêmeas que acasalam resultam em oviposição (Donadio e Gallardo, 1984; García-valdez *et al.*, 2016) e o fato de terem comportamentos complexos na construção do ninho, além da incubação dos ovos (García-valdez *et al.*, 2016), faz com que o custo energético reprodutivo de fêmeas seja bem alto. A espécie também apresenta comportamentos reprodutivos de corte, cópula e territorialidade, este último responsável pela maior área de vida dos machos (Chamut *et al.*, 2012; García-valdez *et al.*, 2016). Contudo, dados sobre o ciclo reprodutivo da espécie ainda são escassos.

O fato de *S. merianae* serem répteis ectotérmicos ou endotérmicos facultativos na estação reprodutiva faz com que o contato com agrotóxicos possa diminuir o seu metabolismo que já é baixo por natureza, diminuindo assim sua eficiência metabólica, entretanto mais dados são necessários para determinar se as diferenças fisiológicas e metabólicas estão relacionadas com a toxicidade de contaminantes (Weir *et al.*, 2015).

Apesar de uma ampla distribuição geográfica, pesquisas com *Salvator merianae* são escassas. Um estudo sobre a fisiologia desta espécie em áreas de referência e expostas, fora do período de hibernação pode contribuir para que medidas sejam tomadas auxiliando na conservação da espécie.

Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar possíveis alterações em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Salvator merianae* em áreas com diferentes níveis de exposição a agrotóxicos. Os biomarcadores estabelecidos para o diagnóstico de impacto ambiental nesta espécie de lagarto de grande porte típico da América do Sul são marcadores de função hepática plasmática como albumina (ALB), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transpeptidase (GGT); de metabolismo intermediário (glicose sérica (GLI), proteínas totais (Pt), ácido úrico (AU), triglicerídeos (TGL), VLDL); endócrino, como a corticosterona (COR); e de balanço oxidativo sanguíneo através da quantificação do TBARS, glutathione-S-transferase (GST), e da atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na figura da professora Dra. Laura Verrastro.

Foram realizados esforços amostrais para coletas de sangue em *Salvator merianae* em uma área de cultivo de milho com rotação de cultura com soja exposta a agrotóxicos e uma área de referência na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), no período de dezembro de 2018 a março de 2019 e de agosto de 2019 a janeiro de 2020.

2.1. Licenças

O projeto foi executado após obtenção das licenças de manipulação de animal vivo e coleta de sangue pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob registro 66925-1, e da Comissão de Ética no uso de animais da PUCRS, além do registro de acesso ao patrimônio genético obtido junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN: A4036FB).

2.2 Área de estudo

A Estação Experimental Agronômica da UFRGS está localizada na Rodovia BR-290, km 146, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul -30°05'29''S e 51°40'15,4''O (Fig. 4) (UFRGS, 2018). Possui um total de 1560 hectares, onde são desenvolvidas pesquisas como áreas de lavouras e áreas preservadas de bioma da Depressão Central do RS (UFRGS, 2018).

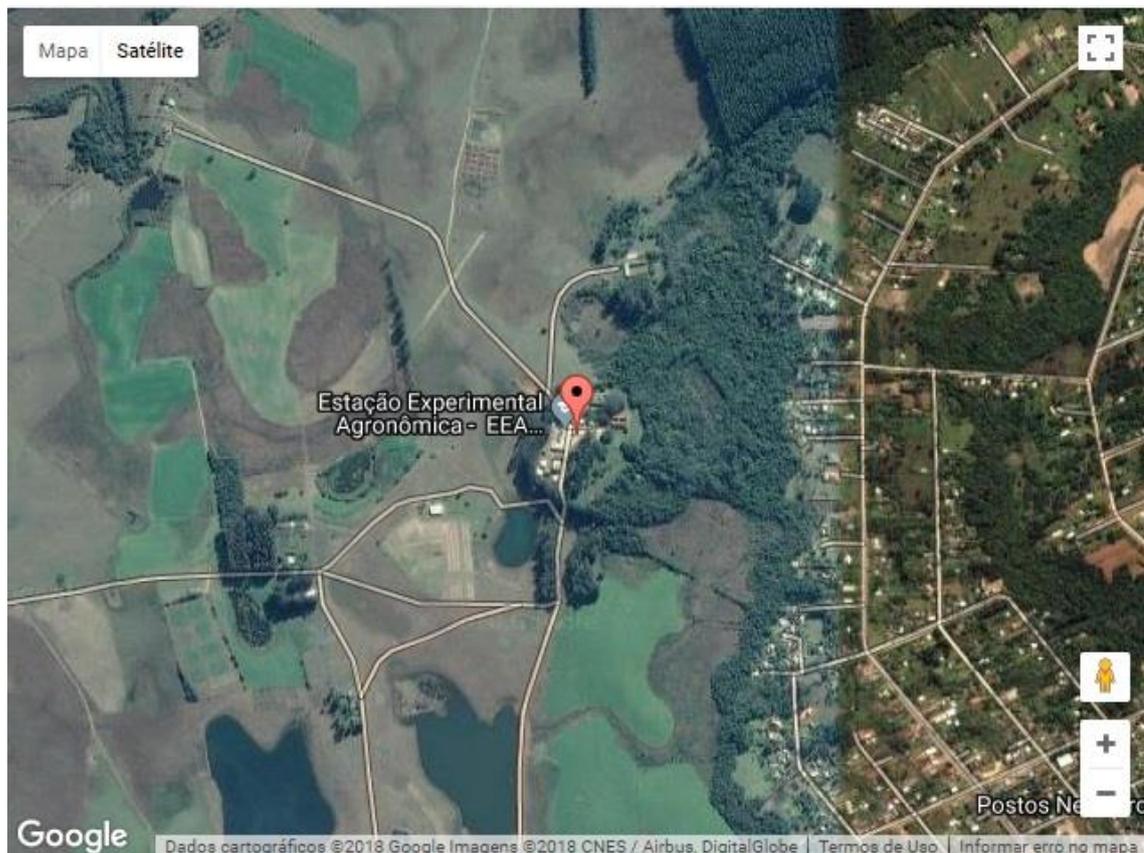


Figura 4: Mapa de localização da Estação Agronômica da UFRGS. Fonte: UFRGS (2018)

Para as coletas de sangue de *Salvator merianae*, foram escolhidas duas áreas, uma exposta a agrotóxico em um cultivo de milho e soja ($30^{\circ}05'09''S$ $51^{\circ}40'56''O$) e uma de referência, sem exposição ($51^{\circ}05'17''S$ $51^{\circ}40'13''O$) (Fig. 5) garantindo uma distância entre elas (aproximadamente 2 km) maior que a maior área de vida da espécie, cerca de 5,87 ha. Outros cultivos próximos da área de referência com aplicação de pesticidas possuem uma distância de aproximadamente 1 km, porém também se encontram fora do raio da maior área de vida dos lagartos. A possibilidade de serem adicionados como pontos de estudo foi descartada pelo fato de não terem sido encontrados lagartos nestas regiões.

Na área exposta são aplicados os agrotóxicos contendo os seguintes princípios ativos: glifosato; 2,4-D; metsulfuron metila e paraquat, todos com ação herbicida, nos meses de janeiro, fevereiro, maio, junho, julho, outubro e novembro. A característica de ambas as áreas foram semelhantes, com algumas árvores e habitações antrópicas próximas. Vale ressaltar que inicialmente, havia sido escolhido um terceiro ponto de amostragem dentro de um pomar onde a quantidade de agrotóxicos aplicada era maior

do que a da área exposta escolhida. Entretanto, não houve a captura de nenhum animal, o que fez com que esta área também não pudesse ser utilizada no trabalho.

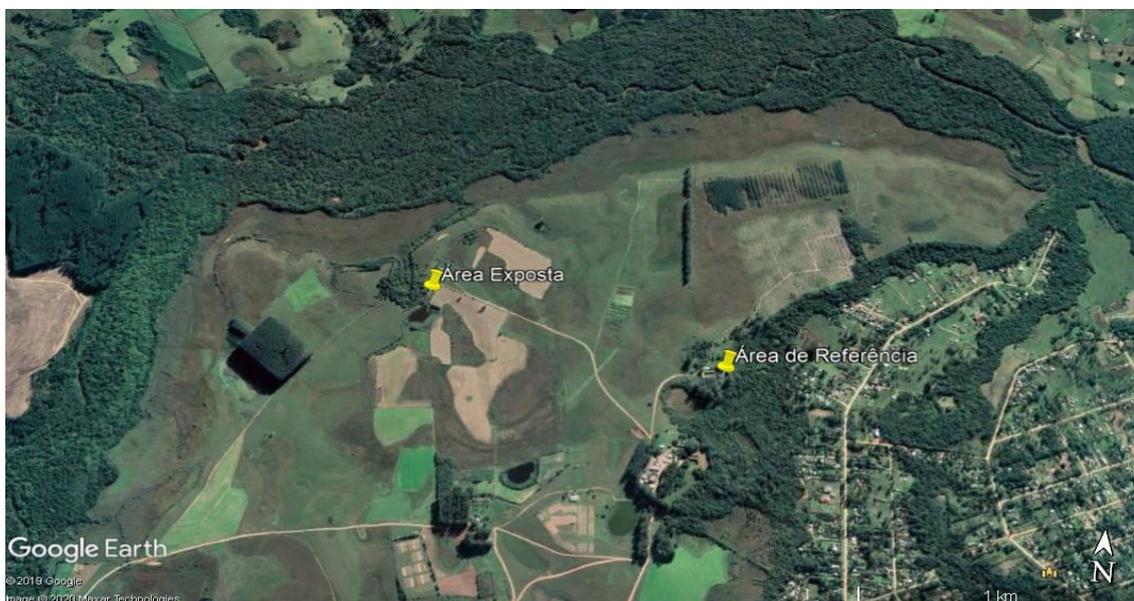


Figura 5: Mapa de localização das áreas de coleta de *Salvator merianae* em cultivo de milho e soja na Estação Agrônômica da UFRGS.

O fato de não ser um estudo em laboratório, ter as áreas escolhidas para estudo de certo modo próximas é vantajoso, tendo em vista que, ao estudar alterações fisiológicas, mudanças mínimas nas condições meteorológicas podem ter alguma interferência nos resultados. O clima da região se caracteriza por ser úmido e quente (Vieira *et al.*, 2015). Dados da temperatura, umidade relativa do ar, radiação, precipitação e velocidade dos ventos foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMet) (Tabela 1) para Porto Alegre, distante 56 Km de Eldorado do Sul.

Tabela 1: Parâmetros abióticos observados durante o ciclo anual para a região da grande Porto Alegre, onde esta incluída a área de coleta dos animais. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão.

	Hibernação			Pós-hibernação		
	Outono	Inverno	Médias hibernação	Primavera	Verão	Média Pós-hibernação
Temperatura (°C)	21,296 \pm 1,164	15,900 \pm 1,403	18,598	19,330 \pm 1,561	25,539 \pm 0,955	22,434
Umidade Relativa do ar (%)	84,774 \pm 3,340	78,119 \pm 1,833	81,446	76,120 \pm 1,523	70,083 \pm 3,206	73,101
Precipitação (mm)	0,258 \pm 0,075	0,127 \pm 0,026	0,192	0,208 \pm 0,081	0,228 \pm 0,147	0,218
Velocidade do vento (m/s)	1,408 \pm 0,098	1,277 \pm 0,065	0,753	1,560 \pm 0,057	1,638 \pm 0,111	1,599
Radiação (kJ/m ²)	625,696 \pm 95,677	477,299 \pm 53,528	551,497	812,571 \pm 70,191	1095,544 \pm 73,789	954,057

2.3 Captura dos animais

Foi obtido um N total de 28 animais, sendo três juvenis de área exposta e 9 de referência, 3 fêmeas de área exposta e 4 de referência, e 3 machos de área exposta e 5 de referência, tendo apenas uma recaptura. Todos os animais capturados foram pesados, medidos, marcados e liberados após a coleta de sangue, nenhum animal veio a óbito após a coleta de material biológico. Os parâmetros bioquímicos foram quantificados em triplicata. O número de animais foi semelhante a dados obtidos na literatura para a mesma espécie de lagarto (Tabela 2).

Tabela 2: Número de animais de *S.merianae* utilizados em trabalhos encontrados na literatura.

Autor	N*	Objetivo do trabalho
Zena et al., 2019	20	Variação sazonal de marcadores metabólicos Sazonalidade
Klein et al. 2003	27	Fisiologia respiratória
Ribas, ER; 2005	8	Variação sazonal da temperatura corpórea
Schaumburg et al, 2012	20	Biomarcadores de genotoxicidade
Zena et al., 2020	22	Correlação entre variação hormonal e ciclo de atividade e temperatura do corpo

Os indivíduos foram capturados mensalmente fora do período de hibernação, através do uso da armadilha Schramm, duas unidades e Tomahawk, 12 unidades. Foram colocadas sete armadilhas em cada área, as quais foram espalhadas aleatoriamente em ambos os locais a fim de abranger todas as classes etárias (juvenis, fêmeas e machos). Estas armadilhas foram revisadas de uma em uma hora no período entre 8:00 e 18:00 horas.

A separação em machos e fêmeas foi feita através de dimorfismo sexual onde o macho apresentar músculos pterigomandibulares hipertrofiados formando uma papada bem aparente, ausente em fêmeas (Donadio e Gallardo, 1984). Além disso, fêmeas e machos adultos apresentam uma média de tamanho de CRC de $35,95 \pm 2,8$ cm e de $37,51 \pm 3,17$ cm respectivamente (Oliveira, 2015). Para evitar a coleta de sangue em

indivíduos já capturados no mesmo mês, os animais foram marcados com etiquetas numeradas antes da soltura (Fig.6).



Figura 6: Indivíduo de *S. merianae* marcado com etiqueta de identificação pré-soltura.

2.4 Medidas corporais e coleta de sangue

Os animais tiveram o comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento caudal (CC- iniciado a partir da cloaca) medido com o auxílio de uma fita métrica e a massa corporal determinada com uso de dinamômetro. A medida do comprimento total (CT) foi calculada através de valores de CRC+CC. Já a relação massa/CT e relação massa/CRC foi calculada através da divisão da massa corporal do animal pelo CT ou CRC.

A técnica utilizada para a coleta de amostra de sangue para as análises foi por punção cardíaca com seringa heparinizada, sem a necessidade de eutanásia dos animais. A quantidade de sangue coletada foi aproximadamente de 0,5-1 ml/ animal, nunca excedendo 10% da massa corporal (Sykes *et al.*, 2015).

Após coletado, o sangue foi acondicionado em tubos cônicos (*falcons*), misturado com heparina e mantido sob refrigeração até decantação dos elementos celulares. Após 24 horas, o plasma foi retirado com pipeta Pasteur e imediatamente congelado em freezer -20°C , as células sanguíneas que compõem o precipitado também foram congeladas; armazenadas em caixas térmicas até serem levados para o laboratório de Fisiologia da Conservação da PUCRS onde ficaram congeladas em freezer a -80°C até serem processadas. (Oliveira *et al.*, 2018).

2.5 Marcadores de função hepática

A determinação de albumina foi feita pelo método de verde de bromocresol (Doumas *et al.*, 1970) através de soro sanguíneo. A albumina tem propriedades de se ligar a moléculas complexas de corante de verde de bromocresol, quando isso acontece um desvio do pico de absorção é promovido e a cor formada é medida colorimetricamente em 630 nm (BIOTÉCNICA).

A alanina transaminase (ALT) catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato resultando na formação de glutamato piruvato. Com a ação da lactato desidrogenase (LDH), o piruvato é reduzido à lactato e a coenzima NADH é oxidada a NAD ocorrendo redução na absorbância de 340 nm o que é diretamente proporcional à atividade de ALT na amostra de plasma (BIOTÉCNICA).

A fosfatase alcalina (FAL) do plasma hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato. A quantidade da enzima presente na amostra é determinada pela velocidade de formação de p-nitrofenol que é medida fotometricamente em 405 nm (BioTécnica).

A gama glutamil transpeptidase (GGT) catalisa a transferência do grupo glutamyl para a glicilglicina formando p-nitroanilina, a qual a quantidade formada apresenta absorbância elevada em 405 nm. Este é diretamente proporcional a quantidade de GGT na amostra de plasma (BIOTÉCNICA).

2.6 Marcadores de metabolismo intermediário e endócrino

A glicose foi quantificada pelo método da glicose oxidase que catalisa a oxidação da glicose (GLI) presente na amostra formando peróxido de hidrogênio que vai reagir com 4-aminoantipirina e fenol através de uma reação oxidativa de acoplamento. Desta reação,

vai ser originado quinonímia, um composto de cor rosa, a qual a intensidade da cor será proporcional à concentração de glicose sérica na amostra de plasma (BioTécnica).

As proteínas totais do soro foram determinadas pelo método de biureto através do kit comercial de proteínas totais da BioTécnica. O método consiste em soluções de proteínas colocadas em um meio alcalino e diluídas em íons cúpricos formam colorações que variam de rosa à púrpura quando ocorre a formação de um complexo de íons de cobre e nitrogênio proveniente das ligações peptídicas, tendo uma absorção de 550 nm (Freiman *et al.*, 1999).

O ácido úrico (AU) plasmático foi determinado pela oxidação em alantoina e peróxido de hidrogênio pela enzima uricase. O peróxido de hidrogênio formado reage com o reagente fenólico DHBS e 4-aminoantipirina na presença de peroxidase originando o composto rosa quinonímia. Assim sendo, a intensidade da cor será diretamente proporcional a concentração de AU na amostra (BioTécnica).

Os triglicerídeos (TGL) plasmáticos são determinados quando a lipoproteína lipase hidrolisa as triglicérides liberando glicerol livre, que através da ação da enzima glicerol quinase será convertido em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. Após isso, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4- aminoantipirina e 4-clorofenol pela catálise de peroxidase, produzindo quinonímia que tem absorbância máxima de 505 nm. A formação da cor rosa é diretamente proporcional à concentração de TGL na amostra (BioTécnica). A partir da divisão do valor dos triglicerídeos por cinco foi possível quantificar também o colesterol VLDL.

A corticosterona é um glicocorticoide secretado pela glândula adrenal, que tem sua expressão aumentada em situações de estresse, estando sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Para a quantificação de corticosterona foi utilizado o Kit de ELISA E-EL-0160 da Elabscience, desenvolvido para ratos e galinhas, com uma sensibilidade de 0,24 ng/ml e uma faixa de quantificação entre 0,39 e 25 ng/ml g/ml; sendo quantificada em uma absorbância de 450 nm. Os resultados foram logaritmizados e expressos em ng de corticosterona/mL de plasma. Sendo calculados, com base em uma curva padrão estabelecida para concentrações conhecidas do hormônio (0- 25 ng de corticosterona/mL de plasma) (Fig.7). O ensaio de quantificação da corticosterona foi realizado no mesmo dia, utilizando o mesmo kit. O coeficiente de variação intra-ensaio

foi de 11,67%, calculado em réplicas obtidas no ensaio com os padrões e todas as amostras.

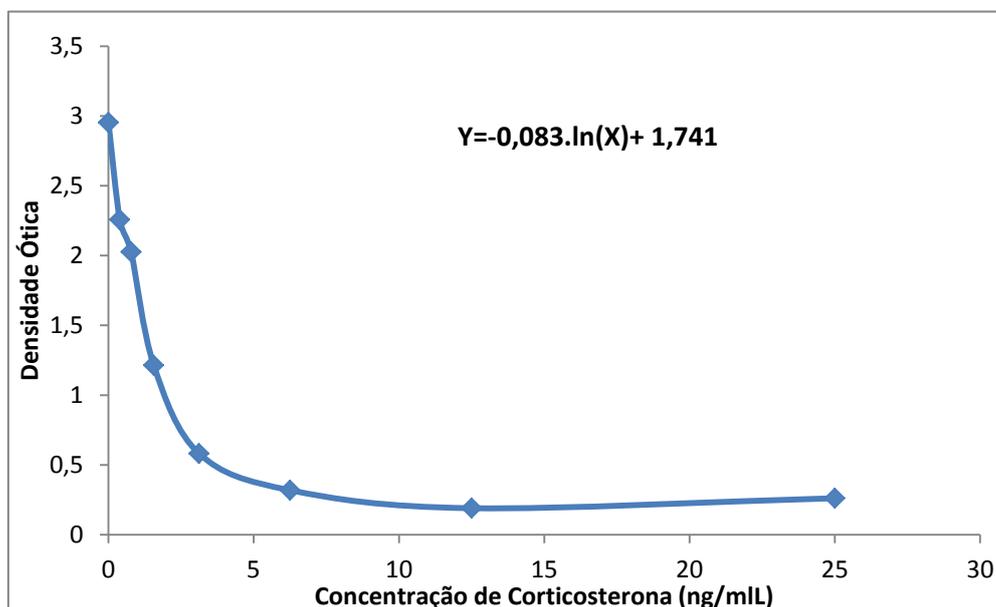


Figura 7: Curva padrão de Corticosterona obtida no ensaio hormonal.

2.7 Balanço oxidativo

Os parâmetros de balanço oxidativo foram quantificados em lisado de células hemáticas em uma proporção de 1ml de células para 6ml de tampão fosfato (20mM) acrescido de cloreto de potássio (140mM) e PMSF (1mM) em pH de 7.4. Após a homogeneização das células com turrax estas foram submetidas a uma centrifugação de 10.000 rpm por 10 minutos e sob refrigeração (4°C).

Os níveis de lipoperóxidação (LPO) foram determinados pela sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os produtos derivados formados podem ser determinados em absorvância de 532 nm conforme método descrito por Lima *et al.* (2001).

A SOD é determinada pela técnica de inibição do radical superóxido com a adrenalina. Entretanto, não é possível determinar a concentração desta enzima; sendo utilizada assim, uma quantificação em unidades relativas que é definida como a quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de redução da adrenalina. A concentração de SOD é expressa em U de SOD por mg de proteínas⁻¹ (Oliveira, 2015). A atividade de CAT foi determinada pelo método de decomposição de peróxido de

hidrogênio em uma absorvância de 240 nm de acordo com Boveris *et al.* (1973) e os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (μ moles de H₂O₂) por min.

A atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) foi medida de acordo com o método descrito por Boyland & 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 340nm; 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; Jakoby, 1981). Desta atividade é descontada a reação basal, obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e a presença da amostra e posteriormente é colocado o CNDNB. 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 CNDNB. A atividade da GST é expressa como mmoles de conjugado CNDNB.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média \pm erro padrão, sendo estes testados quanto a sua distribuição através do teste de normalidade de Kolmogorof-Smirnov. Os resultados obtidos para cada categoria (juvenis, fêmeas e machos) foram comparados entre as áreas por teste T de Student para dados paramétricos ou Mann-Whitney para não paramétricos. Para a comparação entre os resultados experimentais entre as áreas considerando todas as categorias juntas (juvenis, fêmeas e machosa) foi realizado Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foi adotado o nível de significância de 5% com as análises estatísticas realizadas com o programa BioEstat 5.0.

3 RESULTADOS

3.1 Medidas corporais

Foram analisadas medidas corporais de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC) e massa corporal. Dos resultados obtidos, só foram observadas diferenças significativas na massa corporal de juvenis ($p=0,0069$), com juvenis expostos apresentando menor massa corporal que os de referência e no comprimento caudal das fêmeas ($p=0,0193$), que eram significativamente maiores na área exposta (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros das médias de medidas corporais de comprimento rostro cloacal e comprimento caudal, e massa corporal de juvenis, fêmeas e machos de *S. merianae*. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão.

Parâmetros	Medidas corporais					
	Juvenis		Machos		Fêmeas	
	Referência	Exposta	Referência	Exposta	Referência	Exposta
CRC (cm)	30 \pm 0,76	30 \pm 5,13	42,6 \pm 0,60	40,66 \pm 1,64	35,22 \pm 1,42	37 \pm 1,09
	P= 0,9479		P= 0,1855		P= 0,4797	
CC (cm)	39,03 \pm 3,54	43,53 \pm 8,03	51,06 \pm 3,81	47,66 \pm 9,49	35,12 \pm 6,56	62,33 \pm 2,33
	P= 0,5791		P= 0,8815		P= 0,0193	
Massa corporal (kg)	1,05 \pm 0,08	0,48 \pm 0,16	3,32 \pm 0,13	2,73 \pm 0,40	1,87 \pm 0,25	1,96 \pm 0,34
	P= 0,0069		P= 0,1418		P= 0,837	

Medidas de comprimento total (CT), relação massa/CT e relação massa/CRC também foram analisadas (Tabela 4). Para os juvenis, a relação massa/CT ($p=0,0058$) e relação massa/CRC ($p=0,0335$) foram significativamente diferentes entre as áreas, sendo maior na área de referência. Foi observada diferença significativa no CT de fêmeas ($p=0,0339$), sendo estas maiores em área de referência em relação às fêmeas da área exposta, porém, não diferem quanto à relação massa/CT e relação massa/CRC. Já nos machos, nenhuma diferença significativa foi observada nesses parâmetros.

Tabela 4: Parâmetros das médias de medidas corporais de comprimento total (CT), relação massa/CT e relação massa/CRC em fêmeas e machos de *S. merianae*. Os resultados foram expresso como média \pm erro padrão.

Parâmetros	Medidas corporais					
	Juvenis		Machos		Fêmeas	
	Referência	Exposta	Referência	Exposta	Referência	Exposta
CT (cm)	69 \pm 3,59	74 \pm 13,16	93,66 \pm 4,26	88,33 \pm 8,91	70,32 \pm 7,15	99 \pm 2,92
	P= 1		P= 0,5605		P= 0,0339	
Relação massa/CT	15,23 \pm 0,99	7,23 \pm 2,76	35,76 \pm 2,34	31,50 \pm 4,98	22,84 \pm 1,86	19,84 \pm 3,48
	P= 0,0058		P= 0,4058		P= 0,4493	
Relação massa/CRC	34,78 \pm 2,21	17,67 \pm 6,81	77,88 \pm 2,55	66,68 \pm 7,60	45,15 \pm 4,43	53,22 \pm 8,14
	P= 0,0335		P=0,1364		P= 0,3907	

3.2 Marcadores de função hepática

Não houve diferença significativa entre as áreas para os juvenis quando se refere à fosfatase alcalina ($p=0,4634$) (Fig.8), ALT ($p=1$) (Fig.8), Gama GT ($p=0,4321$) (Fig.8) e albumina ($p=0,3861$) (Fig.8). As fêmeas também não diferiram entre área exposta e de referência para fosfatase alcalina ($p=0,4386$) (Fig.9), alanina transaminase ($p=0,6171$) (Fig.9), Gama GT ($p=0,0782$) (Fig.9) e albumina ($p=0,1213$) (Fig. 9). O mesmo aconteceu para os machos com fosfatase alcalina ($p=0,1309$) (Fig.10), alanina transaminase ($p=0,4273$) (Fig.10), Gama GT ($p=0,6434$) (Fig.10), albumina ($p=0,894$) (Fig.10).

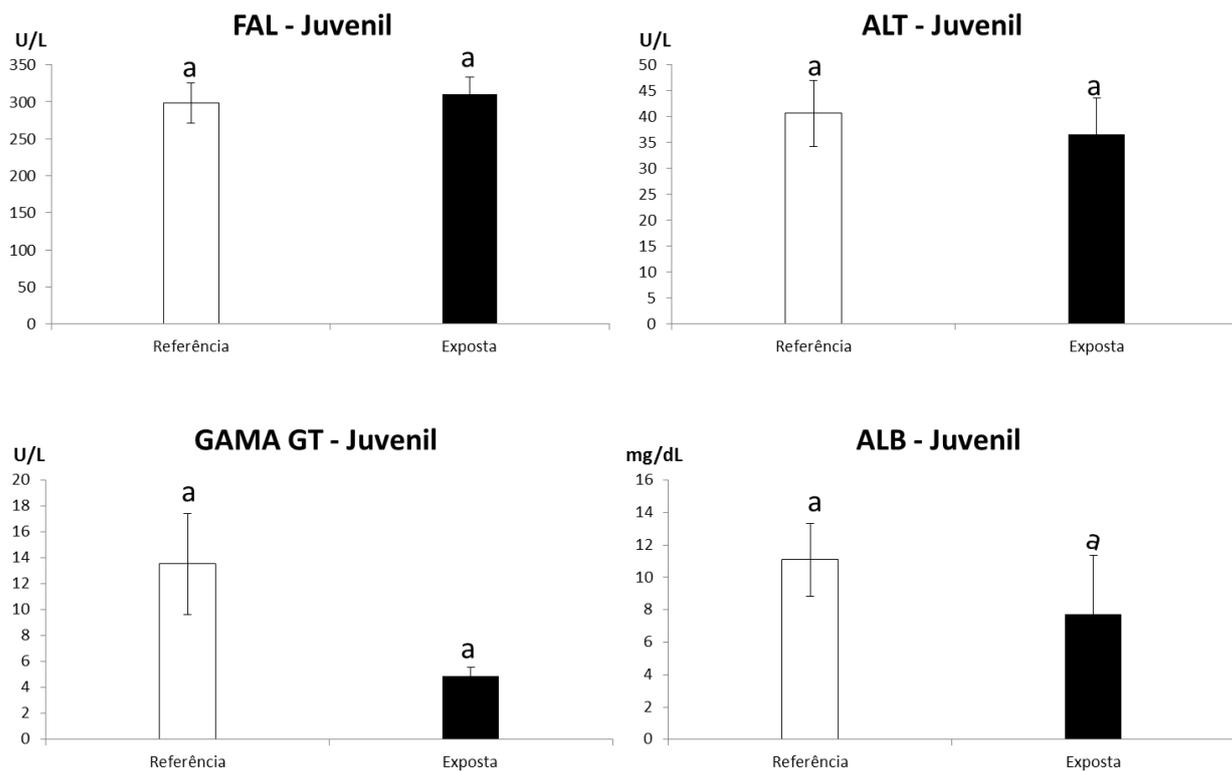


Figura 8: Valores de área exposta e de referência para fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, gama GT e albumina de juvenis de *S. merianae*. Foi utilizado um N de 9 animais para área de referência e 3 em área exposta para fosfatase alcalina e albumina, 8 na área de referência e 3 na exposta para alanina aminotransferase e Gama GT. As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$.

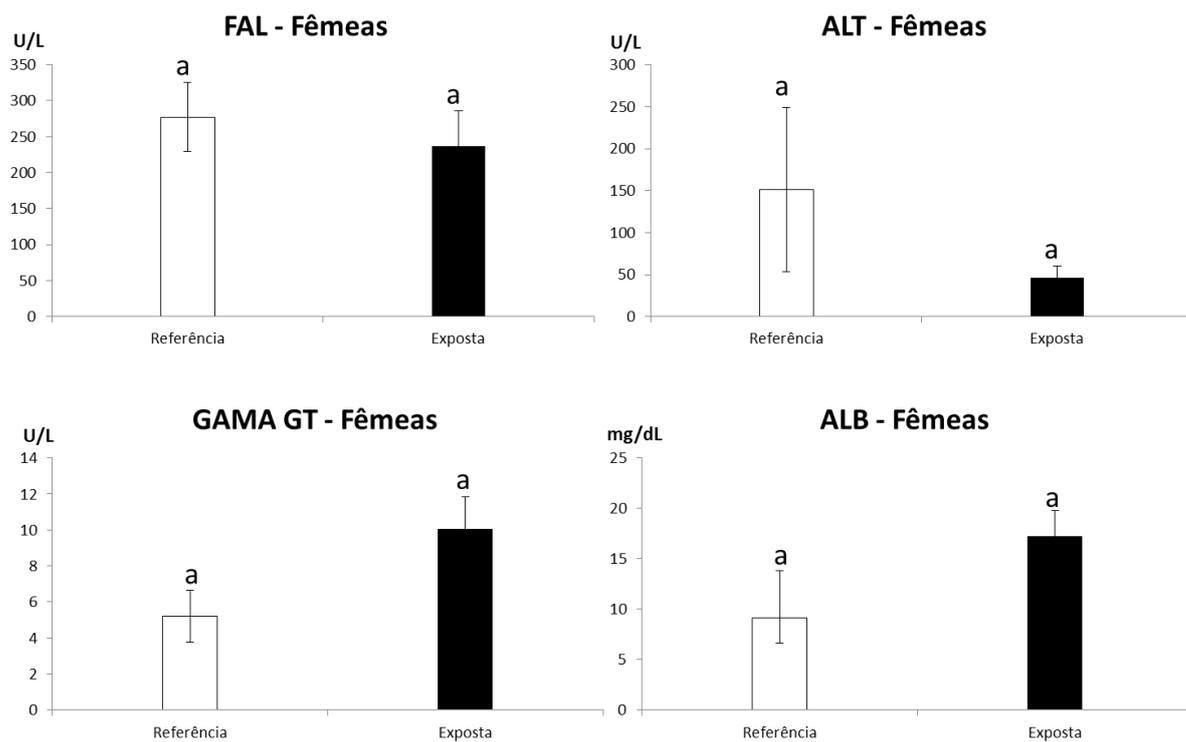


Figura 9: Valores de área exposta e de referência para fosfatase alcalina (FAL), alanina aminotransferase (ALT), gama GT e albumina (ALB) de fêmeas de *S. merianae*. Foi utilizado um N de 4 para área de referência e 3 animais em área exposta para fosfatase alcalina e albumina, 3 na área de referência e exposta para Gama GT, 4 na área de referência e 3 na exposta para alanina aminotransferase. As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$.

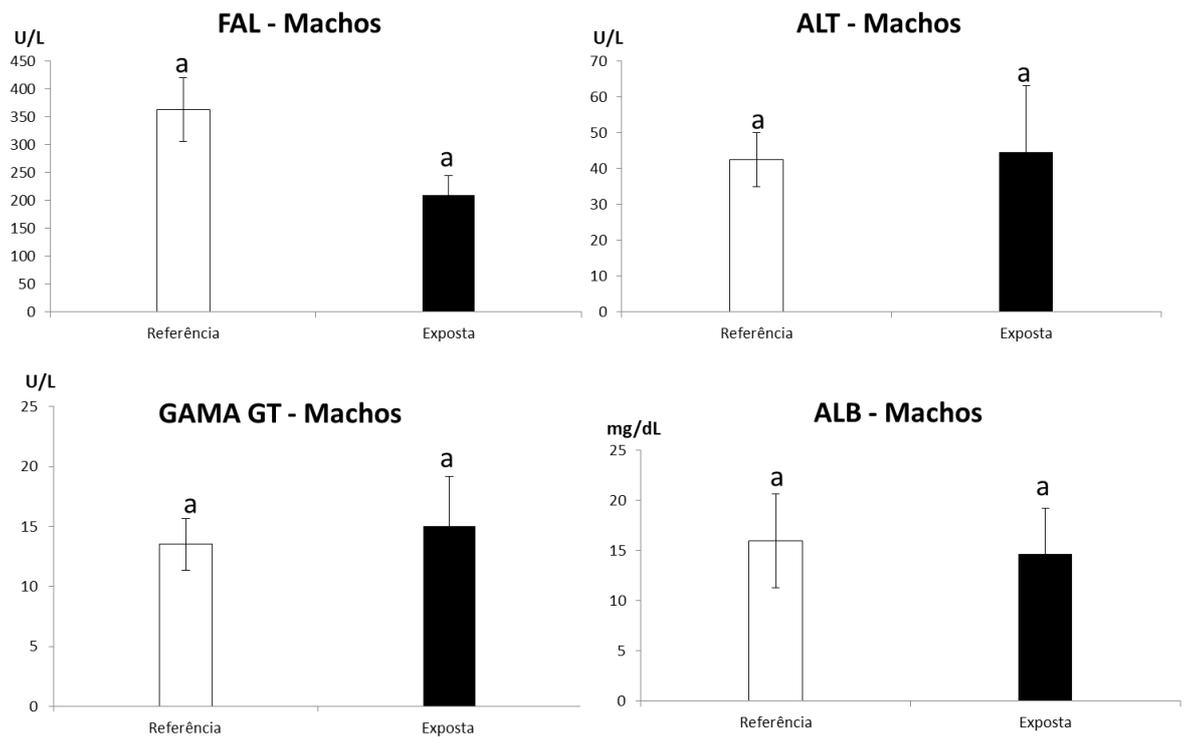


Figura 10: Valores de área exposta e de referência para fosfatase alcalina (FAL), alanina aminotransferase (ALT), gama GT e albumina (ALB) de machos de *S. merianae*. Foi utilizado um N de 5 para área de referência e 4 animais em área exposta para fosfatase alcalina e albumina, 4 na área de referência e exposta para Gama GT, 5 na área de referência e 4 na exposta para alanina aminotransferase. As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$.

3.3 Marcadores de metabolismo intermediário e endócrino

Não houve diferença significativa entre as áreas para as proteínas totais plasmáticas ($p=0,0894$) (Fig.11) dos juvenis. Contudo, há diferença significativa ($p < 0,05$) (Fig.11) para o ácido úrico entre os juvenis coletados na área exposta e de referência, com valores menores encontrados na área exposta.

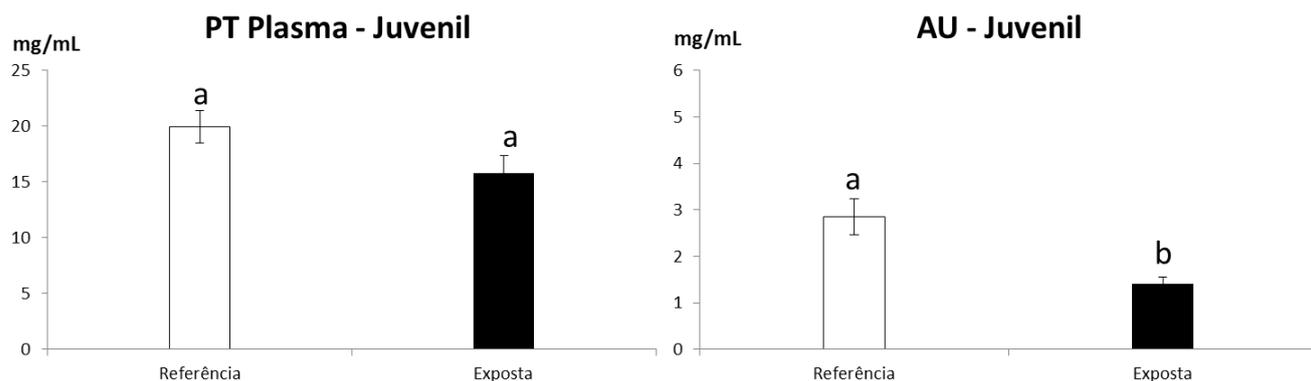


Figura 11: Valores de proteínas plasmáticas e ácido úrico para juvenis de *S. meriana* em área exposta (N=3 para PT e AU) e de referência (N=9 para PT e AU). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas

Em relação às proteínas totais plasmáticas das fêmeas, foi observada uma diferença significativa ($p=0,033$) (Fig.12), sendo estas maiores na área exposta. Para os valores de ácido úrico ($p=0,2008$) (Fig.12) não foram constatadas diferenças significativas para as fêmeas; já para os valores de proteínas plasmáticas ($p=0,4642$) e o ácido úrico ($p=0,3172$) dos machos não observamos diferenças quando comparamos as áreas entre si (Fig.13). Não foram observadas diferenças na área de referência ao comparar machos, juvenis e fêmeas para proteínas totais plasmáticas. Entretanto, na área exposta os juvenis diferem das fêmeas significativamente ($p=0,05$), com níveis mais elevados de proteínas para as fêmeas.

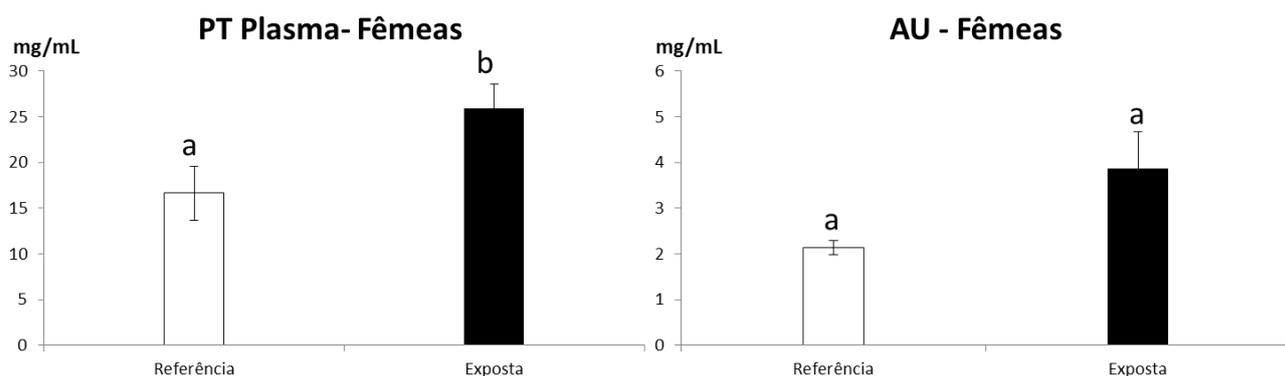


Figura 12: Valores de proteínas (PT) e ácido úrico plasmáticos para fêmeas de *S. meriana* em área exposta (N=3 para PT e AU) e de referência (N=4 para PT e AU). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p<0,05$

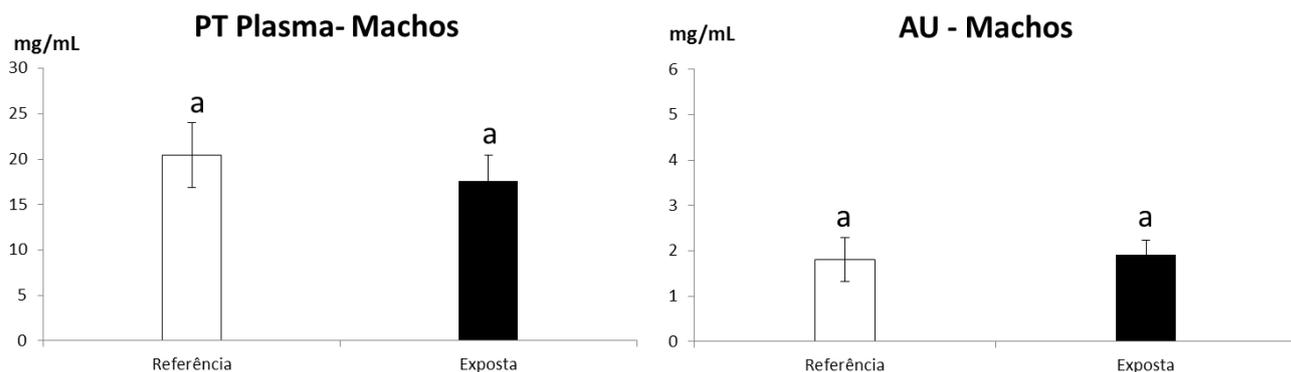


Figura 13: Valores de proteína e ácido úrico plasmático para machos de *S. merianae* em área exposta (N= 4 para PT e AU) e de referência (N= 5 para PT e AU). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

Os níveis de corticosterona não diferiram significativamente ($p=0,588$) (Fig.14) para juvenis entre as áreas, o mesmo ocorreu para glicose ($p=0,3515$) (Fig. 14). Entretanto, os valores de triglicerídeos e VLDL circulante apresentaram níveis significativamente mais elevados ($p=0,0224$) (Fig.14) na área de referência do que na exposta a agrotóxicos.

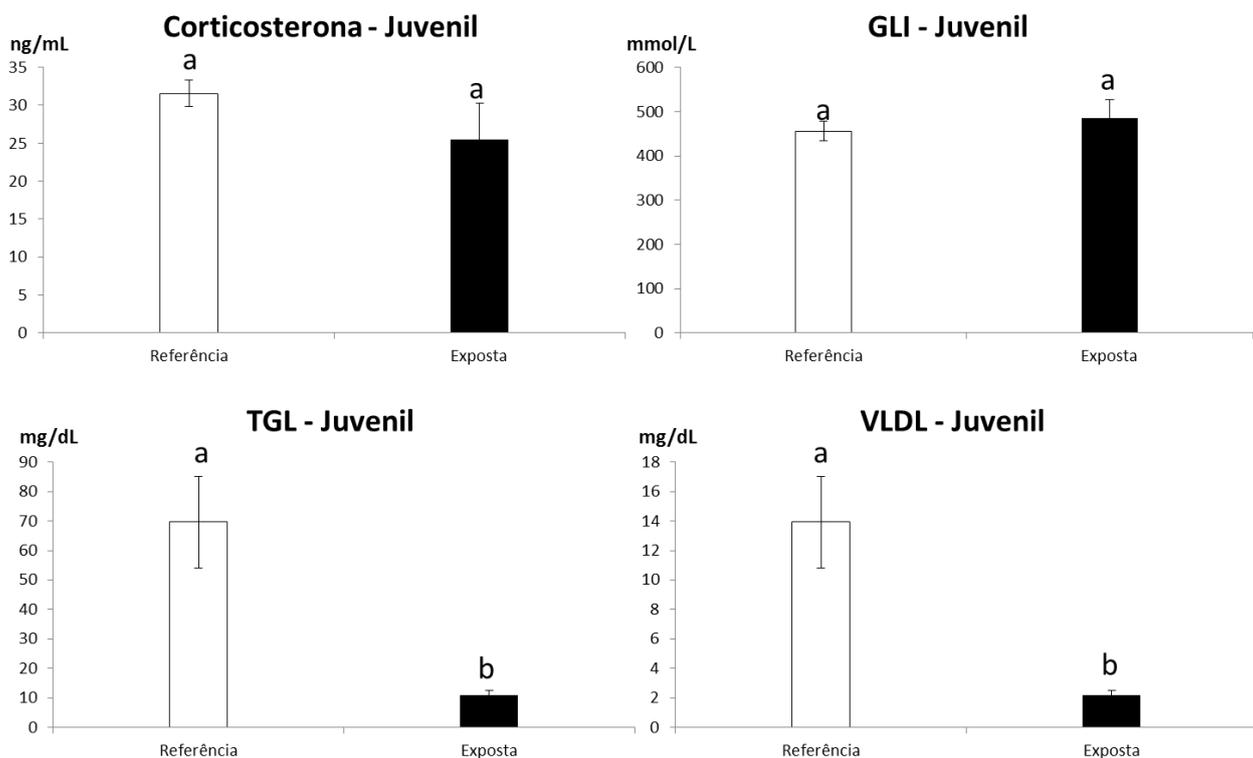


Figura 14: Níveis plasmáticos de corticosterona, glicose (GLI), triglicerídeos (TGL) e VLDL para juvenis de área exposta (N=3) e de referência (N=9). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

Em relação aos adultos, não observamos diferença significativa para os níveis de corticosterona ($p=0,4142$) (Fig.15), glicose ($p=0,4574$) (Fig.15), triglicerídeos e VLDL ($p=0,7762$) (Fig.15) no plasma de fêmeas. O mesmo ocorreu para os machos com valores não significativos de corticosterona ($p=0,1783$)(Fig.16) e de triglicerídeos e VLDL ($p=0,5914$)(Fig.16) entre as áreas. Todavia, foi observada uma diferença significativamente maior de glicose ($p=0,0063$) (Fig.16) em machos da área exposta em relação aos da área referência.

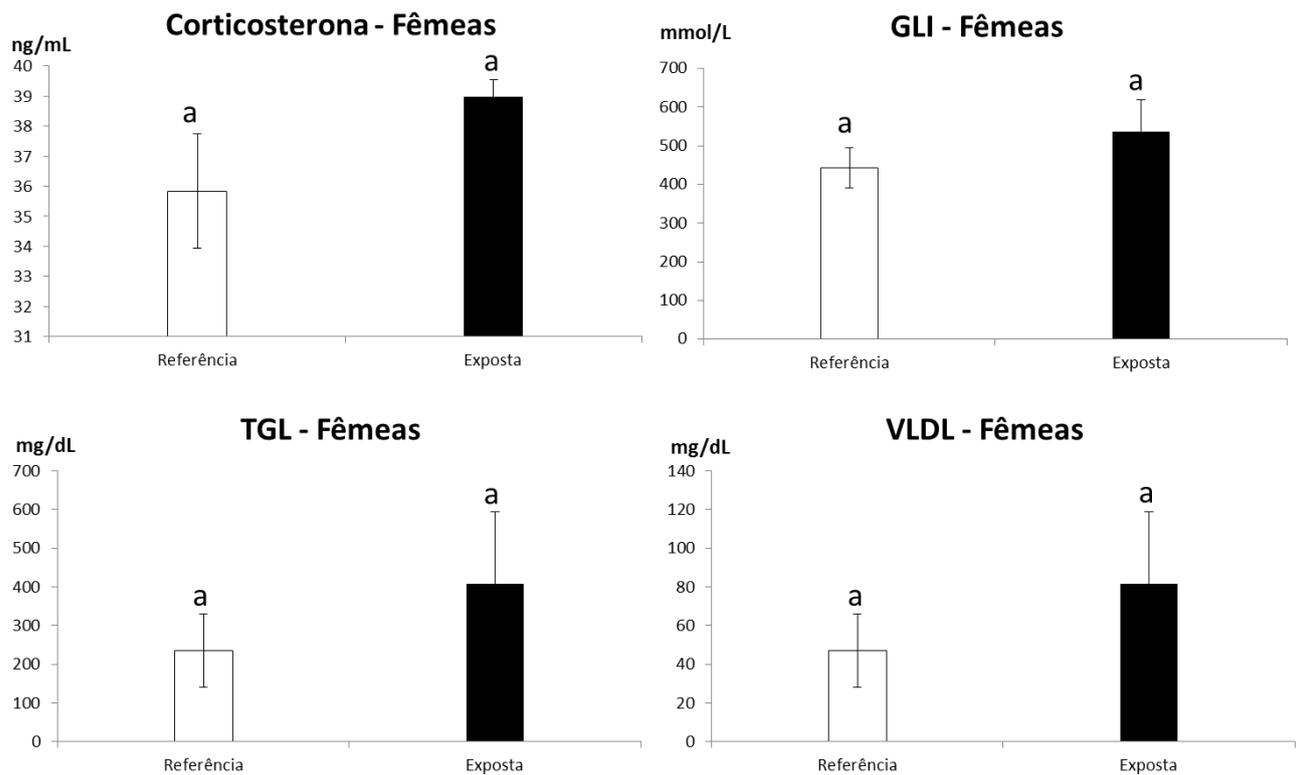


Figura 15: Níveis plasmáticos de corticosterona, glicose (GLI), triglicerídeos (TGL) e VLDL para fêmeas de área exposta (N=3) e de referência (N=4). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

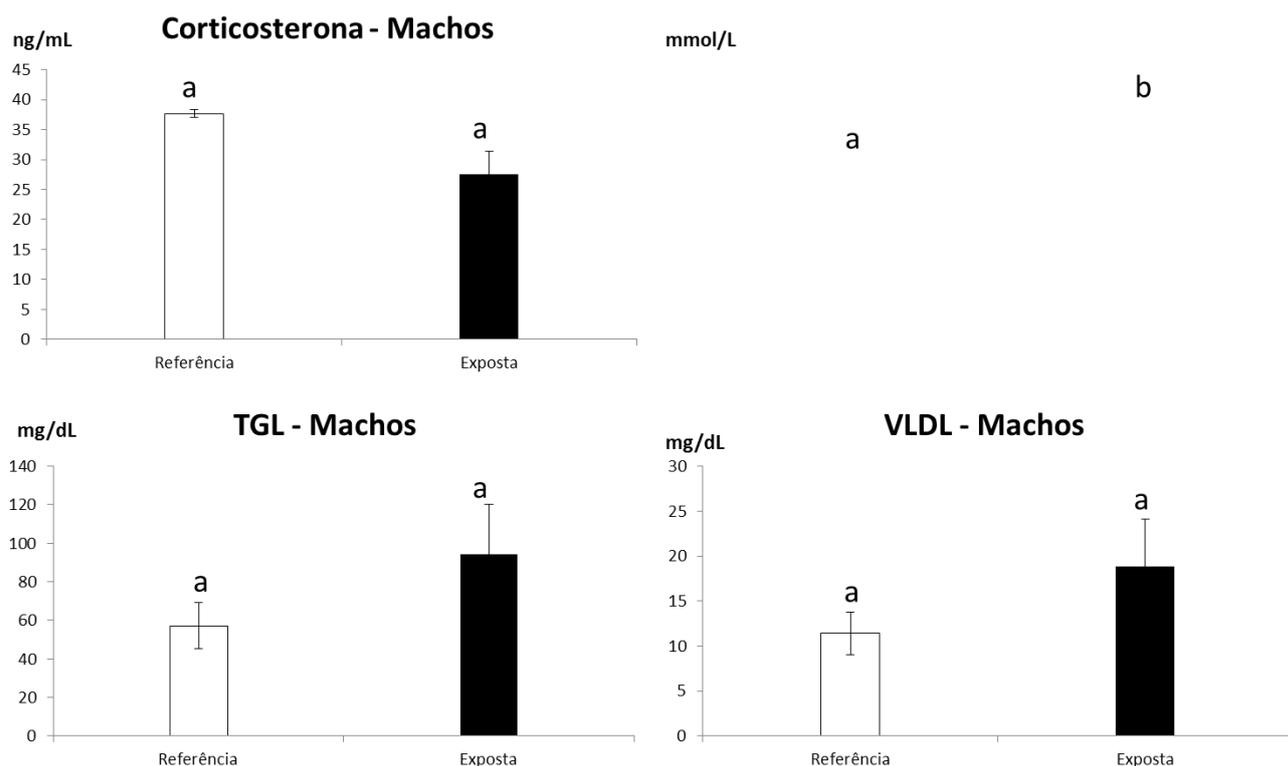


Figura 16: Níveis plasmáticos de corticosterona, glicose (GLI), triglicerídeos (TGL) e VLDL para machos de área exposta (N=4) e de referência (N= 5). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

3.4 Balanço Oxidativo

Ao se tratar de lipoperoxidação (LPO) em juvenis, foi constatado que os níveis deste foram significativamente maiores (2,5 vezes) em animais da área exposta a agrotóxicos quando comparados aqueles da área referência ($p = 0,0001$) (fig.17). No presente estudo, fêmeas ($p = 0,3423$) (Fig.18) e machos ($p = 0,959$) (Fig.19) da área exposta não apresentaram diferenças significativas em relação aos níveis de LPO quando comparados ao grupo controle (área referência).

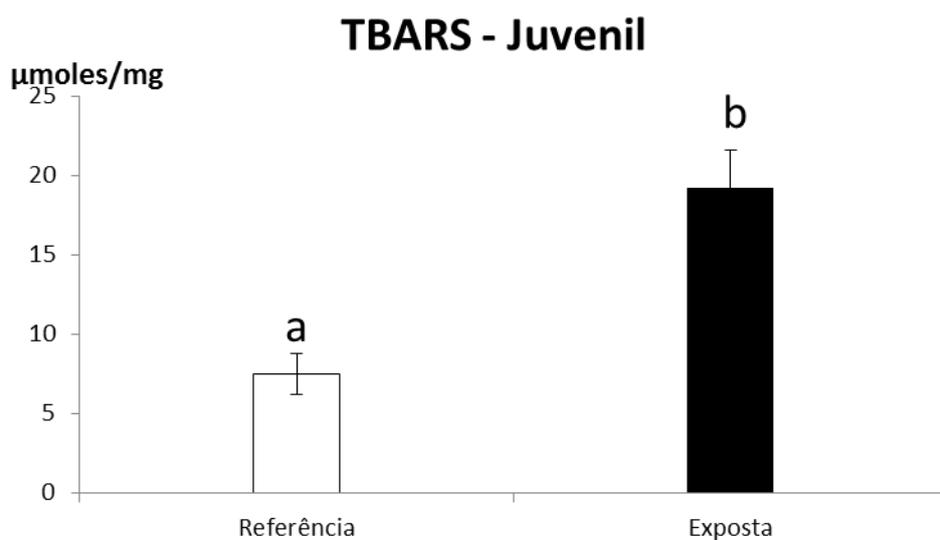


Figura 17: Valores de lipoperoxidação lipídica representados por TBARS para juvenis de área exposta (N=3) e de referência (N=9). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

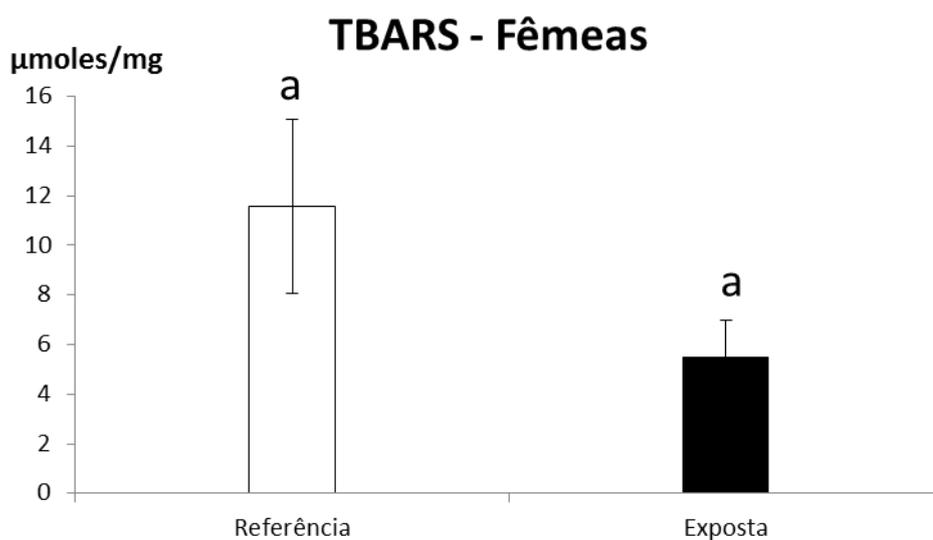


Figura 18: Valores de lipoperoxidação lipídica representados por TBARS para fêmeas de área exposta (N=3) e de referência (N=4). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

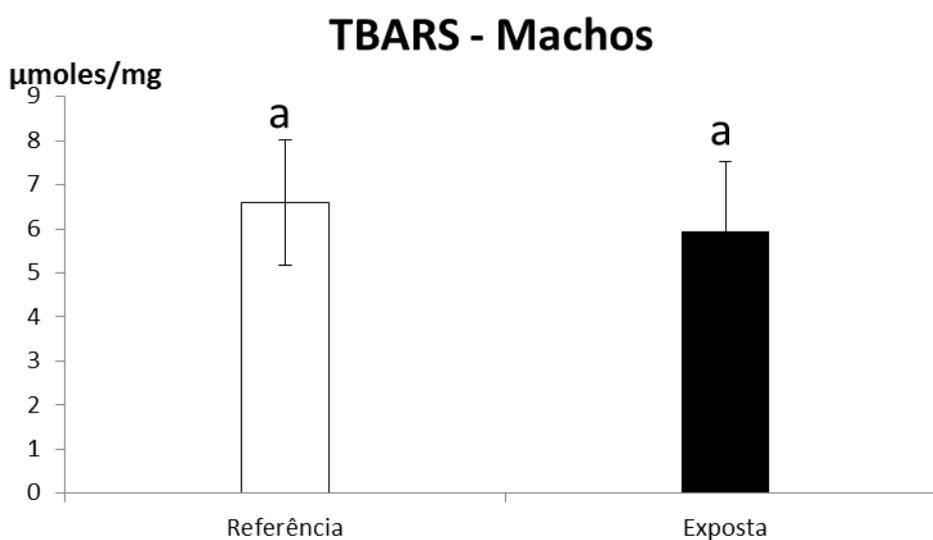


Figura 19: Valores de lipoperoxidação lipídica representados por TBARS para machos de área exposta (N=4) e de referência (N=5). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

Em juvenis, a atividade da SOD em lagartos de ambas as áreas estudadas apresentaram valor bastante semelhante, não sendo a diferença significativa ($p=0,3906$) (Fig.20). O mesmo padrão foi observado para a CAT ($p=0,3151$) (Fig.20), apesar dos animais coletados na área exposta terem uma maior atividade enzimática (1,96x maior) que aqueles da na área referência.

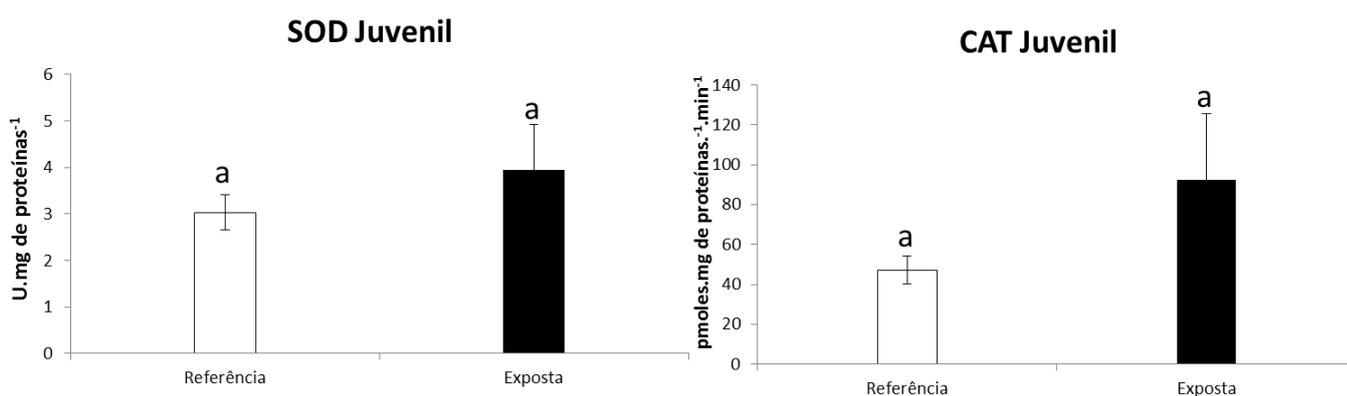


Figura 20: Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) para juvenis de área exposta (N=3) e de referência (N=9). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

Em fêmeas da área exposta verificamos uma diminuição significativa da SOD ($p=0,0021$) e uma não variação ($p=0,6698$) dos níveis de CAT em relação aos animais da área de referência (Fig. 21). Em machos houve uma redução significativa tanto da atividade da SOD ($p=0,004$) como da CAT ($p=0,0281$) nos lagartos da área exposta em relação aos da referência (Fig.22).

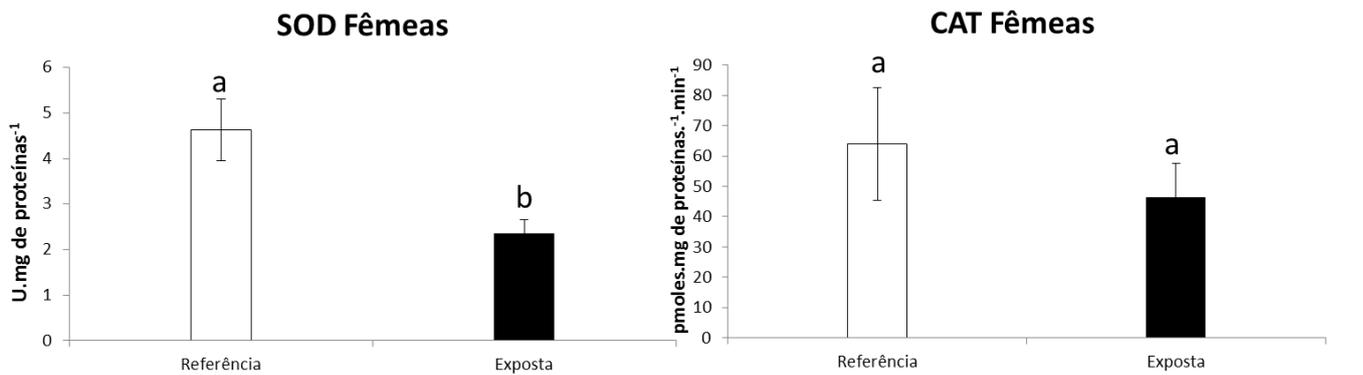


Figura 21: Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) para fêmeas de área exposta (N=3) e de referência (N=4). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p<0,05$

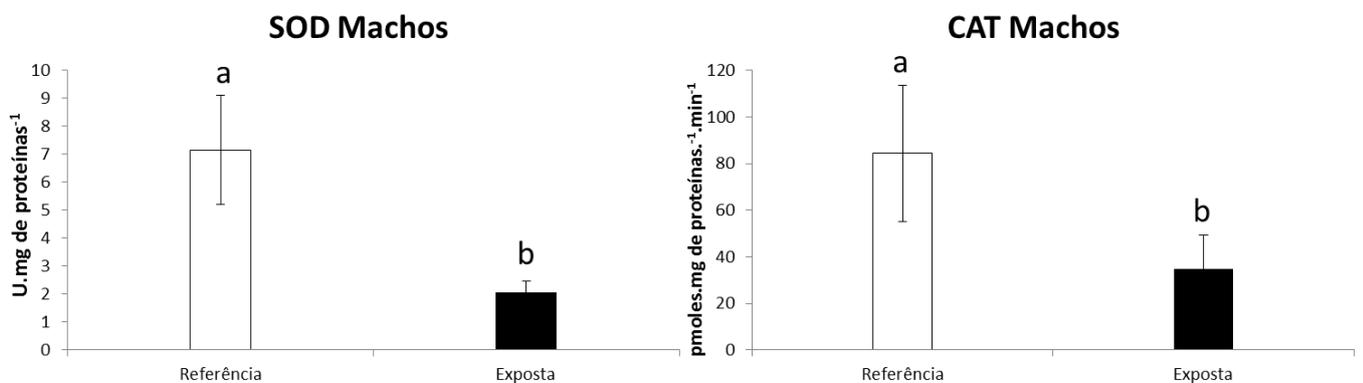


Figura 22: Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) para machos de área exposta (N=4) e de referência (N=5). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p<0,05$

Em relação aos níveis de atividade da GST, verificamos um aumento significativo ($p=0,0137$) (Fig.23) em juvenis da área exposta. Já os machos mostraram uma diminuição significativa da GST ($p=0,004$) (Fig.24) em relação aos animais da área referência. Além disso, verificamos que os níveis de proteínas totais nos eritrócitos de

juvenis da na área exposta foi significativamente menor que na área de referência ($p=0,039$).

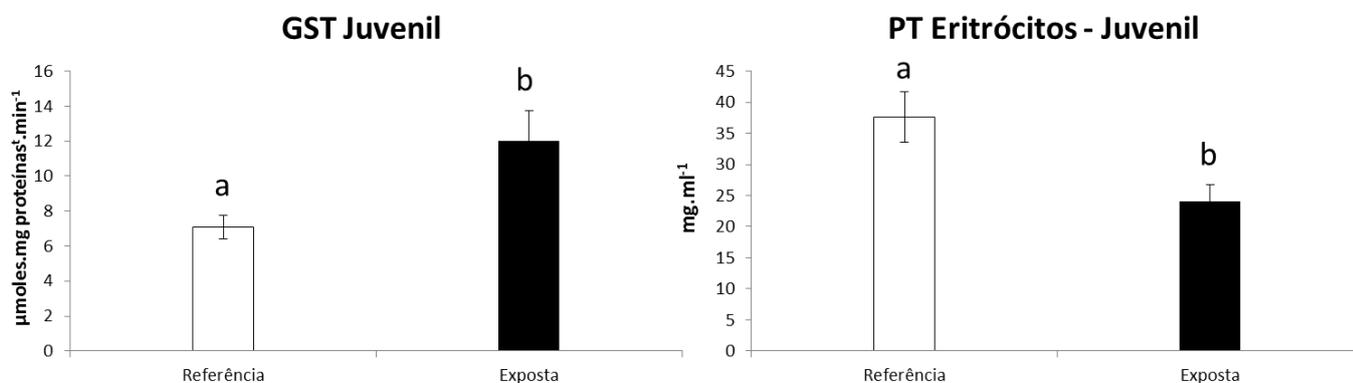


Figura 23: Atividade da glutatona-S-transferase (GST) e prote\u00ednas totais (PT) em eritr\u00f3citos de juvenis coletados em \u00e1rea exposta (N=3) e de refer\u00eancia (N=9). As barras representam as m\u00e9dias \pm erro padr\u00e3o e letras diferentes representam diferen\u00e7as significativas para um $p<0,05$

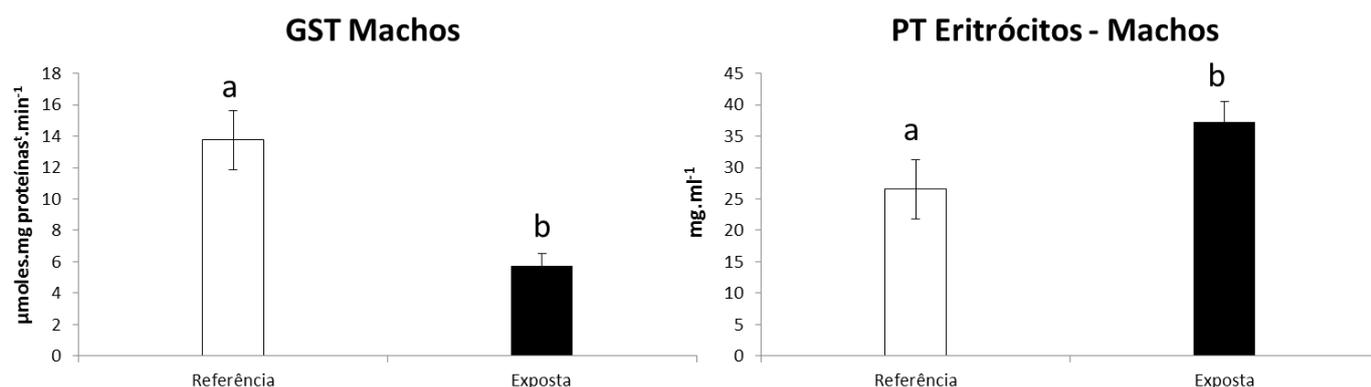


Figura 24: Atividade da glutatona-S-transferase (GST) e prote\u00ednas totais (PT) em eritr\u00f3citos de machos de \u00e1rea exposta (N=4) e de refer\u00eancia (N=5). As barras representam as m\u00e9dias \pm erro padr\u00e3o e letras diferentes representam diferen\u00e7as significativas para um $p<0,05$

Os n\u00edveis de PT nos machos estavam significativamente aumentados nos animais expostos ($p=0,0281$) (Fig.24). As f\u00eamas da \u00e1rea exposta n\u00e3o apresentam diferen\u00e7as entre os n\u00edveis de GST ($p=0,7223$) e nem de PT ($p=0,5224$) (Fig.25).

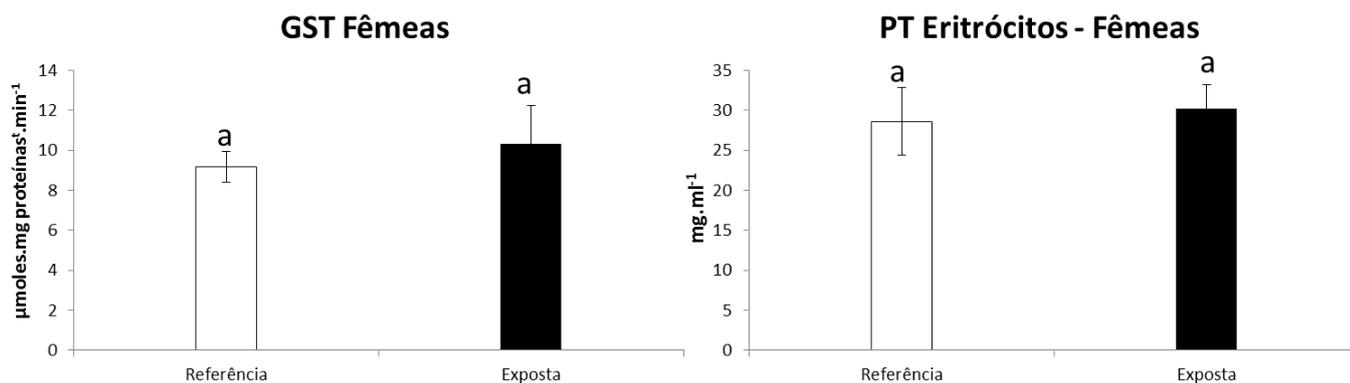


Figura 25: Atividade da glutiona-S-transferase (GST) e proteínas totais (PT) em eritrócitos de fêmeas de área exposta (N=3) e de referência (N=4). As barras representam as médias \pm erro padrão e letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$

4 DISCUSSÃO

4.1 Medidas corporais

Em relação às medidas corporais de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC) e massa corporal, apesar dos juvenis de área exposta apresentarem um tamanho corporal semelhante aos de área de referência, a massa corporal dos juvenis de área exposta é 2,2 vezes menor que aqueles da área referência. Tal fato nos permite sugerir que estes animais estão desviando energia de seu crescimento corporal para garantir sua sobrevivência.

Já em fêmeas, as de área exposta têm um maior comprimento de cauda e CT apesar de terem um CRC e massa corporal semelhante às fêmeas de área referência. Um comprimento maior total e de cauda em fêmeas da área exposta pode ser um indicativo de que essas fêmeas estão alocando uma energia maior para seu desenvolvimento em detrimento da reprodução. Estudos futuros para confirmar esta possível relação em *S. merianae* para estes aspectos precisam ser desenvolvidos.

Diferenças significativas também foram observadas na relação massa/CT e relação massa/CRC em juvenis entre as áreas, sendo maior na área de referência, o que pode sugerir uma melhor qualidade de vida na área sem aplicação de agrotóxico. Já para as fêmeas, apesar de ter sido observada diferença significativa no CT, sendo estas maiores em área exposta em relação às fêmeas da área de referência, não diferiram quanto à relação massa/CT e relação massa/CRC.

Isto pode estar relacionado também a uma alteração no seu padrão de reprodução. Segundo Speakman (2008), em mamíferos os custos fisiológicos da reprodução podem ser diretos ou indiretos. Os custos diretos incluem as demandas de energia e de nutrientes para os eventos reprodutivos e para as mudanças morfológicas necessárias. Já os custos indiretos podem ser custos compensatórios opcionais; portanto, os animais optam por reduzir seus investimentos em algum outro aspecto de sua fisiologia para maximizar o fluxo de recursos na reprodução. No caso das fêmeas de área exposta do presente estudo, pode estar havendo um *trade-off* direcionado para crescimento ao invés da questão reprodutiva, tendo em vista os esforços necessários para sobrevivência frente a contaminantes.

4.2 Marcadores de função hepática

O contato com pesticidas pode causar alterações em enzimas de função hepática com a intensidade desta resposta variando com o tipo de pesticida, sua concentração, o tempo de exposição e a espécie em estudo (Arguedas *et al.*, 2018). No presente estudo, não foram observadas alterações significativas no que se refere aos marcadores de dano hepático analisado.

Apesar de não ter havido diferenças significativas para nenhum marcador de função hepática em todas as categorias (juvenis, fêmeas e machos), um estudo com a tartaruga *Caretta caretta*, mostra uma correlação negativa de GGT e ALT, onde altos níveis desta última estão associados a baixos níveis de GGT quando os animais tem contato com um pesticida (Camacho *et al.*, 2013). Ao menos para os juvenis nós também observamos esta relação entre ALT e GGT.

Já em outro estudo com *Bothrops asper* foi obtido resultado semelhante para a albumina, uma proteína que serve como marcadora de dano hepático, isto é ausência de variação quando os animais foram expostos a clorpirifos (Arguedas *et al.*, 2018). Assim, ao se tratar da albumina para todas as categorias etárias analisadas não foram observadas diferenças significativas; porém, é possível observar um comportamento diferente para machos e fêmeas, com fêmeas tendo níveis maiores de albumina na área exposta e os machos na área de referência.

Na maioria dos vertebrados, a albumina é sintetizada de forma integral no fígado, compondo cerca de 50% das proteínas plasmáticas (Gonzalez E Silva, 2006). Segundo

Thrall *et al.* (2015), a concentração de albumina pode ser afetada não só pela perda de função hepática como também pela presença de processos inflamatórios orgânicos (albumina também é uma proteína de fase aguda negativa) e parasitismo, que consomem esta proteína.

Além disto, alterações do equilíbrio hidroeletrólítico podem alterar os valores desta proteína plasmática diluindo ou concentrando-a, assim como o *status* nutricional ao qual o animal está exposto, o que pode influenciar na produção e no consumo da mesma. A não variação desta proteína nos animais expostos pode indicar a ausência de dano hepático e explicar as variações de albumina em fêmeas e machos.

Não foram observadas diferenças significativas ao comparar juvenis, machos e fêmeas entre si para fosfatase alcalina (FAL). Porém, é possível observar que existem comportamentos diferentes entre eles em relação à área exposta e de referência, onde na área exposta os juvenis possuem concentrações mais altas de FAL e na área de referência esta situação ocorre em machos. Conforme Gonzalez e Silva (2006), em mamíferos a maior parte de FAL sérica tem origem hepática; porém, deve se levar em consideração a possibilidade do aumento de FAL não ser de origem hepática, mas sim das outras isoformas, como por exemplo, a óssea ou renal. A FAL está presente em vários tecidos dos répteis e possuem função de atividade osteoblástica (Silva *et al.*, 2010).

O mesmo ocorreu para Gama GT, onde animais da área exposta têm um padrão diferente, com os machos tendo níveis maiores e as fêmeas menores nesta área; mas ambos, machos e fêmeas da área exposta apresentam valores mais elevados. A Gama GT em répteis é hepato-específica e costuma ter baixos valores em condições normais (Divers *et al.*, 2000) o que pode sugerir um impacto dos agrotóxicos no fígado de animais coletados na área exposta e assim, um possível dano hepático. Em mamíferos a GGT é uma enzima que pode estar elevada em lesão hepática aguda, e pode ser encontrada na maioria dos tecidos corporais, dentre eles, pâncreas, rins, glândula mamaria de cadelas, ovelhas e vacas, mas os níveis desta enzima que estão presentes no plasma sanguíneo têm geralmente origem hepática, com maior concentração dos túbulos biliares (Thrall *et al.* (2015).

Já para alanina aminotransferase, não foi observada nenhuma diferença neste estudo. A ALT nem sempre tem seu valor alterado na ocorrência de dano hepático (Divers *et al.*,

2000), por isso, um estudo juntamente com outras enzimas é necessário para ter certeza da existência de dano.

4.3 Marcadores de metabolismo intermediário e endócrino

Apesar de não haver diferença em relação aos triglicerídeos e VLDL foi possível observar para fêmeas que esses valores se encontraram mais elevados nas duas áreas ao serem comparadas com juvenis e machos, sendo ainda maior no local exposto a pesticidas. Tal perfil de resposta pode ser devido ao fato de que as fêmeas fazem a postura de ovos, necessitando ter uma maior reserva energética principalmente de lipídios, a fim de garantir a maturação dos gametas, a vitelogênese, à síntese de hormônios reprodutivos, entre outros. Em local exposto essa necessidade é ainda maior visto que é necessária a alocação de energia para a metabolização dos xenobióticos o que pode comprometer a qualidade reprodutiva destes animais.

Oliveira *et al.* (2018) mostraram que para fêmeas de *Thropidurus catalanensis* o período reprodutivo caracteriza-se como um evento biológico de alta demanda energética levando a mobilização dos estoques de energia; os autores também sugerem que esse período representa um ponto crítico em termos de adaptação do animal ao seu ciclo de vida. O VLDL é uma lipoproteína sintetizada no fígado e responsável pelo transporte, principalmente de triglicerídeos e colesterol, deste órgão para os tecidos (Oliveira *et al.* 2018); assim, níveis mais altos podem indicar um aumento da atividade alimentar a fim de garantir a alocação destes lipídios para os processos envolvidos na reprodução além de garantir reservas energéticas para o período de hibernação.

Foi observada uma diferença significativa para ácido úrico em juvenis, com valores menores na área exposta. Não podemos descartar a possibilidade do seu uso como uma molécula antioxidante, visto que os juvenis de área exposta apresentam um incremento nos níveis de TBARS em relação aos da área referência o que levaria a mobilização de componentes do sistema antioxidante.

O ácido úrico é a principal excreta nitrogenada em répteis e também é o produto da digestão de proteínas e do catabolismo de aminoácidos e purinas. Normalmente os níveis de AU costumam ser baixos em répteis devido à ausência da alça de Henle nos rins, perfazendo até 85% dos produtos nitrogenados excretados por estes animais o que evita a perda de água excessiva (Silva *et al.*, 2010). O ácido úrico é, também, um antioxidante

eficaz e doador de elétrons nos processos de metabolização de xenobióticos como demonstrado por Zanette *et al.* (2015) para cracas, e sugerido por Coltro *et al.* (2017) para *Rana catesbeiana*, onde girinos expostos a diferentes concentrações de herbicida a base de quinclorac mostram uma diminuição dos níveis plasmáticos de ácido úrico em altas concentrações deste herbicida.

Os níveis de proteínas em fêmeas costumam ser mais elevados que os dos machos e dos juvenis possivelmente, devido ao custo necessário para reprodução. Em processo reprodutivo, as fêmeas de uma espécie de serpente e de lagarto coletados em área de baixo grau de influencia por agrotóxicos mostram um decréscimo nos níveis de proteínas durante este período (Lourdais *et al.*, 2004; Oliveria *et al.* 2018).

Apesar disso, foi observada uma diferença significativa para o aumento de proteínas totais plasmáticas na área exposta. A constatação desse efeito diferente para as fêmeas de *Salvator merianae* em área exposta pode estar associada com a possibilidade de ocorrência de *trade-off*; onde as fêmeas direcionariam estas proteínas para o custo da metabolização dos xenobióticos e sua sobrevivência nessa área, diminuindo assim o esforço para a reprodução.

A corticosterona é caracterizada por ser um hormônio ligado aos ajustes orgânicos frente a situações de estresse em lagartos, isso porque este realoca a energia de funções não essenciais para eliminar estressores agudos ou crônicos, normalmente conduzindo a um incremento da glicemia e mobilização das proteínas e dos triglicerídeos (Meylan *et al.*, 2010). Ainda assim, não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das categorias (juvenis, fêmeas e machos).

Porém, ao se tratar dos juvenis, esse perfil caracterizado pela ausência de um incremento dos níveis de corticosterona associada a uma diminuição nos níveis de triglicerídeos pode ter como consequência uma redução nas taxas de sobrevivência e/ou crescimento podendo comprometer a capacidade destes animais em lidar com estressores ambientais; como sugerido por Oliveira *et al.*(2018). Além disso, pode sugerir uma melhor condição na capacidade alimentar e/ou menor estresse na área de referência.

Quando comparamos os níveis de corticosterona para as categorias juntas (juvenis x fêmeas x machos) dentro da mesma área observamos uma variação significativa para aqueles coletados na área referência; onde os machos apresentam os maiores níveis deste hormônio. Já na área exposta este padrão de resposta ao hormônio apresenta-se alterado

em comparação a área de referência visto que não verificamos diferenças significativas entre machos, juvenis e fêmeas.

Estudo sazonais desenvolvidos com *S. merianae*, coletados em área de baixo grau de exposição a agrotóxicos, revelou que no período reprodutivo os níveis de corticosterona costumam estar elevados (Zena *et al.*, 2019). Já frente a um contaminante, os níveis de corticosterona podem aumentar, diminuir ou não se alterar dependendo do estressor e do tempo de duração do estresse; onde a possibilidade de aumento deste hormônio pode conduzir a um crescimento e desenvolvimento mais lento (Mestre *et al.*, 2019). A ausência de aumento ou diminuição dos níveis de corticosterona pode refletir uma perda da responsividade do eixo HPA frente a um estressor, como sugerido por Coltro *et al.* (2017) e Wilkens *et al.* (2018) para girinos de rã-touro expostos a herbicidas a base de glifosato, quinclorac e sulfentrazone.

O aumento significativo de glicose em machos pode ser um indício de estresse devido à contaminação no local exposto, com o macho se mostrando mais sensível que as fêmeas. Ou seja, pode relacionar-se com um *trade-off* direcionado para a sobrevivência ao invés de um incremento da atividade exploratória destes em busca da parceira reprodutiva. Um estudo com *Tropidurus catalanensis*, relata o aumento dos níveis de glicose com o fim do período reprodutivo (Oliveira *et al.*, 2018).

4.4 Balanço Oxidativo

Neste estudo, a lipoperoxidação foi determinada através da quantificação dos níveis de TBARS que tem sido considerado uma das melhores medidas para quantificar os danos oxidativos causados por contaminantes (Amaral *et al.*, 2012). Em sistemas biológicos, os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) são encontrados principalmente na composição da membrana plasmática sendo esta um alvo preferencial das EROs (Burela *et al.*, 2018). Os PUFAs são muito susceptíveis a oxidação devido à presença de duplas ligações; assim, sua oxidação conduz a modificações físicas nas membranas celulares, que resultam em alterações na sua fluidez e permeabilidade, comprometendo as funções biológicas, além de produtos secundários que irão estimular ainda mais a produção de EROS (Polleta *et al.*, 2016).

Quando comparamos entre as categorias (juvenis, fêmeas e machos) dentro da mesma área de coleta, não foram observadas diferenças significativas nos animais

coletados na área de referência. Contudo, para os animais coletados na área exposta observamos que os juvenis mantêm níveis de TBARS significativamente mais elevados ($p < 0,05$) que os de fêmeas e de machos, alterando assim o padrão de resposta para TBARS nesta área em relação a área de referência o que possivelmente pode representar um impacto dos contaminantes sobre estes animais. Além disto, tal situação pode ser um indício de que organismos mais juvenis sejam mais vulneráveis que adultos, tendo em vista que este grupo também obteve diferença significativa quando comparado área de referência *versus* exposta dentro da categoria.

Em outros estudos como em ovos de *Caiman latirostris* expostos a formulações de pesticidas foram observados níveis elevados de TBARS nos animais expostos em relação aos não expostos (Burella *et al.*, 2018); já para machos e fêmeas adultos desta espécie Polleta *et al.* (2016) não observaram diferenças significativas para esta análise. Característica semelhante também foi vista para machos adultos de *Podarcis bocagei* expostos ao agrotóxico chlorpyrifos (Amaral *et al.*, 2012).

Uma das formas que o sistema bioquímico tem para neutralizar os efeitos deletérios provenientes das EROs em excesso formadas devido ao contato com agrotóxicos é a ativação das enzimas antioxidantes; sendo elas principalmente a SOD e a CAT (Persch *et al.*, 2017; Burella *et al.*, 2018). Em juvenis de *Trachemys scripta elegans* expostas a um herbicida baseado em glifosato, Héritier *et al* (2017) observaram uma inativação da SOD e ativação da CAT.

A ausência de resposta significativa da SOD e da CAT em juvenis verificada em nosso estudo pode ter sido determinada pelo pequeno número de animais coletados na área exposta. Contudo, não podemos deixar de considerar que os animais da área exposta apresentaram valores mais elevados de TBARS que aqueles da área referência, e isto pode estar sendo determinado por uma incapacidade de incremento da expressão e/ou da atividade destas enzimas (SOD e CAT). Além disso, também foi visto que as proteínas totais dos eritrócitos de juvenis de área exposta foram significativamente menores que na de referência.

No processo de metabolização das EROs ocorre primeiramente a transformação pela SOD do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, posteriormente, vai ser transformado em H_2O e O_2 pela CAT (Halliwell, 2012). No entanto, o O_2^- e o H_2O_2 podem causar inativação e/ou inibição da SOD e da CAT (Burella *et al.*, 2018). Tal

fator pode estar relacionado a diminuição da atividade da SOD nos adultos em ambos os sexos e da CAT somente nos machos.

Apesar da diminuição da atividade destas enzimas antioxidantes não observamos níveis aumentados de TBARS nos animais adultos, o que nos permite sugerir que outros componentes do sistema antioxidante estejam sendo acionados para conter a formação de EROs o que torna os adultos menos sensíveis que os juvenis a estes contaminantes. Não podemos deixar de destacar que os animais foram coletados no período de reprodução desta espécie e que a reprodução pode determinar um incremento da capacidade antioxidante a fim de garantir o sucesso reprodutivo; como verificado por Oliveira *et al.* (*in press*) no fígado de machos e fêmeas de *Trophidurus catalanensis*.

Na comparação de juvenis, fêmeas e machos entre si, novamente não foi observada variação significativa para as enzimas SOD e CAT. Contudo, os animais provenientes da área exposta apresentam um padrão enzimático diferente entre machos adultos e juvenis, apesar de não diferir significativamente, os juvenis apresentaram os maiores níveis de atividade da SOD e CAT na área exposta, onde na referência isto é verificado nos machos.

Em relação a GST, o aumento significativo desta em juvenis de área exposta pode determinar um aumento da capacidade de biotransformação como uma tentativa de metabolizar e facilitar a excreção dos xenobióticos, diminuindo assim o seu tempo de permanência e o impacto sobre o organismo. É possível observar um comportamento inverso na forma de correspondência de GST e PT aos contaminantes entre machos e juvenis (Fig. 23 e 24). A diferença de comportamento entre as categorias etárias (machos e juvenis) pode ser motivo dessa relação contrária.

Foi visto que não houve diferenças significativas para GST e proteínas totais em eritrócitos de fêmeas. Possivelmente, pelo fato de as fêmeas necessitarem formar gametas ricos em vitelo, além de terem que gerar uma prole, estas podem manter um sistema antioxidante e de biotransformação mais robusto que as outras categorias etárias; como verificado por Oliveira *et al.* (*in press*).

Diferentemente das fêmeas, os machos apresentaram uma diminuição significativa para GST em lagartos da área exposta. Valores diminuídos de GST também foram observados em machos de *Podarcis bocagei* expostos ao inseticida orgnofosforado clorpirifós (Amaral *et al.*, 2012). O papel da GST também está relacionado à

decomposição de produtos da lipoperoxidação através da conjugação da glutathione com o xenobiótico a fim de aumentar sua excreção e desintoxicar o organismo sendo então uma defesa secundária e endógena (Wang *et al*, 2019).

Ao comparar todas as categorias etárias consideradas (juvenis, machos e fêmeas) dentro da mesma área (exposta ou referência), não se obteve diferença significativa na área de referência. Todavia, ao se tratar de proteínas foi observado que os juvenis da área exposta mantêm níveis de PT mais elevados ($p < 0,05$) que as fêmeas e os machos desta mesma área, alterando o padrão de resposta. Já quando consideramos os resultados da GST, observamos diferenças significativas nos animais coletados na área referência, onde os níveis de GST são mais elevados nos machos sendo estes diferentes dos juvenis ($p < 0,05$). Também observamos diferença entre as categorias nos animais oriundo da área exposta; contudo, os juvenis são aqueles que apresentam os maiores níveis de atividade GST, sendo este significativamente diferente dos machos.

Os resultados de TBARS sugerem que os juvenis são mais suscetíveis que as fêmeas e os machos quando expostos aos agrotóxicos utilizados nesta área (glifosato; 2,4-D; metsulfuron metila e paraquat), o que em um período mais longo pode comprometer a saúde dos animais diminuindo o ingresso de novos indivíduos nesta população. O aumento dos níveis de TBARS, a diminuição significativa de proteínas totais, juntamente com a manutenção da atividade da SOD e da CAT sugere estresse oxidativo para os juvenis. Além disto, quando comparamos todas as categorias (machos, fêmeas e juvenis) dentro da mesma área de coleta verificamos uma alteração no padrão de atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e da GST em animais coletados nas diferentes áreas sugerindo um impacto negativo sobre esta população.

5 CONCLUSÃO

É possível concluir que a aplicação de agrotóxicos parece afetar principalmente juvenis de *S. merinae*, tendo em vista que tiveram parâmetros como massa corporal, relação massa/CT, relação massa/CRC, ácido úrico, TGL e VLDL, LPO e GST alterados significativamente. A menor massa corporal associada a um incremento do dano oxidativo pode ter um impacto negativo sobre as gerações futuras. Juvenis são organismos ainda em formação, um gasto energético para eliminar xenobióticos pode ter como consequência indivíduos com menor capacidade de sobrevivência, menos

desenvolvidos e/ou com menor sucesso reprodutivo o que os torna mais vulneráveis a predadores, além de futuros adultos menos atraentes para as fêmeas, limitando a descendência.

Além disso, apesar de menos afetadas que os juvenis, as fêmeas também se mostraram suscetíveis aos agrotóxicos empregados nesta área tendo os marcadores como comprimento da caudal, comprimento total, proteínas totais plasmáticas e SOD alterados significativamente. O fato de as fêmeas já terem um gasto energético e metabólico grande em virtude da vitelogênese e de outros aspectos da reprodução, o contato com estes xenobióticos pode conduzir a uma modulação em seus *trade-off*, desviando energia da reprodução para a metabolização e excreção destes químicos e assim, sobreviver a esta exposição. Uma menor carga de energia disponível para os processos reprodutivos pode conduzir a um menor número de descendentes, prejudicando o tamanho populacional da espécie.

Fêmeas e juvenis podem ser considerados essenciais para o crescimento e equilíbrio de uma população. Além disso, também é possível concluir que machos possuem comportamentos bioquímicos contrários ao dos juvenis e das fêmeas parecendo manter melhor sua homeostase e assim evitando, pelo menos em parte, os danos desta exposição. Diferença entre a idade e o comportamento reprodutivo é comum entre as espécies, tendo em vista as diferentes prioridades metabólicas de cada categoria. Entretanto, ainda assim, os machos tiveram alterações significativas na glicose, SOD, CAT, proteínas totais dos eritrócitos e GST podendo ter consequências na questão reprodutiva com a diminuição da busca exploratória por fêmeas e de territorialidade.

A maioria dos estudos existentes de répteis, principalmente em lagartos são feitos em animais de cativeiro, o que apesar de facilitar os resultados, nem sempre retratam a realidade observada *in situ*, já que possuem questões como temperatura e luminosidade, por exemplo, controladas. Este estudo foi realizado em ambiente natural, o que é inédito para a espécie, podendo refletir mais fidedignamente os efeitos de contaminantes em *Salvator meriane*. Além de contribuir para a padronização de uma série de marcadores determinados em amostras de plasma e eritrócitos, amostras estas que são obtidas de forma pouco invasiva. Entretanto, dificuldades como questões de boa qualidade meteorológica e perda de indivíduos da espécie em estudo por predadores domésticos que surgiram nos locais de coleta impossibilitando a obtenção de um N maior. Logo,

estudos futuros visando o incremento do número de *Salvator merianae* ainda se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

- Almeida, Marcelito Trindade, 2009. O Agrotóxico como Tema Problematizador no Ensino de Química na Formação Técnico Agrícola. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Educação Agrícola, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Amaral, Maria José *et al.* 2012. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei*Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 31, n. 10, p.2345-2353. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.1955>.
- Arguedas, Randall *et al.* 2018. Effect of exposition to chlorpyrifos upon plasmatic cholinesterases, hematology and blood biochemistry values in (Serpentes: Viperidae). *Chemosphere*, [s.l.], v. 205, p.209-214. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.111>.
- Artacho, Paulina *et al.* 2007. Blood biochemistry reveals malnutrition in black-necked swans (*Cygnus melanocoryphus*) living in a conservation priority area. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [s.l.], v. 146, n. 2, p.283-290. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.031>.
- Barrigosi, José Alexandre Freitas. 2018. Uso de Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>>. Acesso em: 10 maio 2018.
- Batista, Ch. 2016. Indicadores de lesão e função hepática. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 10.
- Bennett, A. F. & Gleeson, T. T. 1976. Activity metabolism in the lizard *Sceloporus occidentalis*. *PhysioLZooL*, 49, 65-76.
- Betteridge, D. John. 2000. What Is Oxidative Stress? *Metabolism*, Londres, v. 2, n. 49, p.3-8.
- Bombardi, Larissa Mies. 2017. Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia. 296p. São Paulo: FFLCH – USP.
- Boveris, Alberto; Chance, Britton. 1973. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. Great Britain, Filadelfia, p.707-716.
- Burella, P.m. *et al.* 2018. Oxidative damage and antioxidant defense in Caiman latirostris (Broad-snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [s.l.], v. 161, p.437-443. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.006>.
- Brasil. Constituição (1989). Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Artigo 2º.
- Brasil. 2004. Lei nº 10.925, de 23 de julho de 2004.
- Brasil. 2002. Projeto de lei nº 6.299, de 13 de março de 2002.

Brusamarello, Emanuele *et al.*, 2018. Porque saúde ambiental também é uma questão de educação. Cadernos Cajuína, Minas Gerais, v. 3, n. 1, p.100-114.

Carson, Rachel. 1962. Primavera Silenciosa. 2. ed. São Paulo: Portico. 305 p.

Camacho, María *et al.* 2013. Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: Evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles. Science Of The Total Environment, [s.l.], v. 458-460, p.283-289. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.043>.

Chamut, Silvia *et al.*, 2012. Testosterone and reproductive activity in the male tegu lizard, *tupinambis merianae*. Herpetological Conservation And Biology, Estados Unidos, v. 3, n. 7, p. 299-305.

Clements, William H. 2000. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: an overview. Journal Of Aquatic Ecosystem Stress And Recovery, Netherlands, v. 7, n. 2, p.113-116, jun.

Copatti, Carlos Eduardo; Garcia, Luciano de Oliveira; Baldisserotto, Bernardo. 2009. Uma importante revisão sobre o impacto de agrotóxicos em cultura de arroz em peixes. Biota Neotropical, São Paulo, v. 4, n. 9, p.235-242. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n4/pt/abstract?thematic-review+bn00509042009>>. Acesso em: 10 maio 2018.

Costa, L.F., Pires, G.L. de P., 2016. Análise Histórica sobre a Agricultura e o Advento do Uso de Agrotóxicos no Brasil. Etic 2016- Encontro Iniciação Científica 12, 1–17.

Coutinho, Cláudia F. B. *et al.* 2005. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: R. ecotoxicologica e meio ambiente, Curitiba, v. 15, p.65-72.

Divers, Stephen J.; COOPER, John E. 2000. Reptile hepatic lipidosis. Seminars In Avian And Exotic Pet Medicine, [s.l.], v. 9, n. 3, p.153-164. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/ax.2000.7136>.

Donadio, O.E., & J.M. Gallardo. 1984. Biología y conservación de las especies del género *Tupinambis* (Squamata, Sauria, Teiidae) en la República Argentina. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. Zoología 13:117–127.

Dornelles, Michele Flores; Oliveira, Guendalina Turcato. 2014. Effect of Atrazine, Glyphosate and Quinclorac on Biochemical Parameters, Lipid Peroxidation and Survival in Bullfrog Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). Archives Of Environmental Contamination And Toxicology, [s.l.], v. 66, n. 3, p.415-429. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-013-9967-4>.

Doumas, Basil T.; Watson, W. Art.; Biggs, Hommer G. 1970. Albumin standarts and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clinica Chimica Acta, Estados Unidos, p.87-96.

D'amato, Cláudio; Torres, João P. M.; Malm, Olaf. 2002. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - Uma revisão. Química Nova, Rio de Janeiro.

Eisenreich, Karen M.; Rowe, Christopher L. 2012. Experimental exposure of eggs to polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) and possible species-specific differences in debromination. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 32, n. 2, p.393-400. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2061>.

Enzo. Corticosterone ELISA kit. <http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-097/corticosterone-elisa-kit> (acessado em 17 maio 2018).

Fassis, Fabiana. 2014. educação ambiental e o uso de agrotóxicos. 2014. 213 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Educação, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita, Rio Claro.

Folha de São Paulo, 2019. Número de agrotóxicos liberados no Brasil em 2019 é o maior dos últimos 14 anos. <https://www1.folha.uol.com.br/ambiente/2019/12/numero-de-agrotoxicos-liberados-no-brasil-em-2019-e-o-maior-dos-ultimos-14-anos.shtml> (acessado em 10 de janeiro de 2019).

Freiman, Lenice O.; Srur, A. U. O. Sabaa.1999. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merrill). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, [s.l.], v. 19, n. 2, p.170-173. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20611999000200002>.

García-Valdez, María Valeria *et al.*, 2016. Plasmatic Estradiol and Progesterone Variations During the Reproductive Cycle of Captive Female Argentine Red Tegu Lizards, *Tupinambis rufescens*. *Herpetological Conservation And Biology*, Estados Unidos, v. 11, p. 519-526.

Garland Junior, Theodore; Else, Paul L.1987. Seasonal, sexual, and individual variation in endurance and activity metabolism in lizards. *Physiology*, Austrália, v. 252, n. 3, p.439-449. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpregu.1987.252.3.R439>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

G.El Banna, Sabah *et al.* 2009. Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters In rat males exposed to chlorpyrifos. *Slovak J. Anim. Sci, Egito*, v. 3, p.111-117.

Gonzalez F.H.D, Silva S.C.2006. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2a ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. c. 8, p. 318-337.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. 2006. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed.

Habig, William H.; Jakoby, William B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. *Methods In Enzymology*, [s.l.], p.398-405. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77053-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77053-8).

Haddad, Carolyna *et al.* 2019. Agrotóxicos no Brasil: uma violação aos direitos fundamentais. *Jornal Eletrônico Faculdades Integradas Vianna Júnior. Juiz de Fora*, p. 1-19.

Halliwell, Barry. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, [s.l.], v. 70, n. 5, p.257-265. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>.

Harvey, Michael B.; Ugueto, Gabriel N.; Gutberlet Junior, Ronald L. 2012. Review of Teiid Morphology with a Revised Taxonomy and Phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata). 156 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Salisbury University, Auckland.

Hatano, F. H. *et al.* 2001. Thermal ecology and activity patterns of the lizard community of the Restinga of Jurubatiba, Macaé, RJ. *Revista Brasileira de Biologia*, [s.l.], v. 61, n. 2, p.287-294. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-71082001000200011>.

Heath, A. G. (1995). *Water Pollution and Fish Physiology* (2nd Ed ed.): Lewis Publishers.

Hernández, Antonio F. *et al.* 2013. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 61, p.144-151. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.012>. de Janeiro, v. 6, n. 25, p.995-1002, mar. 2002.

Héritier, Laurent *et al.* 2017. Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 36, n. 12, p.3343-3350. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3916>.

Hopkins, William A. 2000. Reptile toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 19, n. 10, p.2391-2393. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620191001>.

Keller, Jennifer M. *et al.* 2004. Associations between Organochlorine Contaminant Concentrations and Clinical Health Parameters in Loggerhead Sea Turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives*, [s.l.], v. 112, n. 10, p.1074-1079. *Environmental Health Perspectives*. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.6923>.

Kiefer, Mara Cíntia; Sazima, Ivan. 2002. Diet of juveniles tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae) in Southeastern Brasil. *Amphibia-reptilia*, S.i., v. 23, p.105-108.

LABTEST. Manual de Reagentes. Disponível em: <<https://labtest.com.br/reagentes/>>. Acesso em: 17 maio 2018.

Lam, A.; Halán, M. 2017. Monitoring of Physiological Changes of Uric Acid Concentration in the Blood of Snakes. *Folia Veterinaria*, [s.l.], v. 61, n. 2, p.56-60. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/fv-2017-0019>.

Lima, Émerson Silva; Abdalla, Dulcineia Saes Parra. 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, p.293-303.

Lin, H.; Decuyper, E.; Buyse, J. 2004. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, [s.l.], v. 139, n. 4, p.745-751. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.014>.

Lourdais, O. *et al.* 2004. Protein catabolism in pregnant snakes (*Epicrates cenchria maurus* Boidae) compromises musculature and performance after reproduction. *Journal Of Comparative Physiology B*, [s.l.], v. 174, n. 5, p.383-391. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-004-0424-6>.

M., Ganeshwade R. 2012. Biochemical changes induced by dimethoate (Rogor 30% EC) in the gills of fresh water fish *Puntius ticto* (Hamilton). *Journal Of Ecology And The Natural Environment*, [s.l.], v. 4, n. 7, p.181-185. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/jene11.134>.

Maixner, J. M.; Ramsay, E. C.; Arp, L. H. 1987. Effects of Feeding on Serum Uric Acid in Captive Reptiles. *The Journal Of Zoo Animal Medicine*, [s.l.], v. 18, n. 2/3, p.62-64. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/20460240>.

Mcewen, Bruce S. *et al.* 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*, Colorado, p.79-133.

Mestre, Ana P. *et al.* 2019. Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [s.l.], v. 169, p.61-67. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.057>.

Meylan, Sandrine; Haussy, Claudy; Voituron, Yann. 2010. Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *General And Comparative Endocrinology*, [s.l.], v. 169, n. 2, p.158-166. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.08.002>.

Monaghan, Pat; Metcalfe, Neil B.; Torres, Roxana, 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, [s.l.], v. 12, n. 1, p.75-92. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>.

Moyes, C.D., Schulte, P. M. 2010. *Princípios de Fisiologia Animal*. 2ª Edição. Ed. Artimed.

Nelson, David L.; COX, Michael M. 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed.

Oliveira, Arthur Schramm. 2015. *Uso da radiotelemetria no monitoramento de lagartos: estudo de caso em *Salvator merianae**. 37 f. Monografia (Especialização) - Curso de Inventariamento e Monitoramento de Fauna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Oliveira, Maiara Rodriguez *et al.* 2018. Seasonal and Sexual Variation of the Intermediate Metabolism and Body Condition Indexes in the Lizard *Tropidurus catalanensis* (Gudynas and Skuk, 1983) (Squamata: Tropiduridae). *South American*

Journal Of Herpetology, [s.l.], v. 13, n. 1, p.85-95. Brazilian Herpetological Society. <http://dx.doi.org/10.2994/sajh-d-17-00073.1>.

Oliveira, Maiara Rodriguez. 2015. Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o status oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae). 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zoologia, Pucrs, Porto Alegre, 2015.

Oost, Ron Van Der; Beyer, Jonny; Vermeulen, Nico P.e. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology And Pharmacology, [s.l.], v. 13, n. 2, p.57-149. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6).

Paz, M.M., García, N.E., Semhan, R.V. et al. 2019. Study of lipid reserves in *Liolaemus koslowskyi* (Squamata: Liolaemidae): reproductive and ecological implications. J Comp Physiol B 189, 595–609. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01226-8>

Peakall, D. W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. Toxicology and Ecotoxicology News, 1, 55-60.

Poletta, Gisela L.; Simoniello, María Fernanda; Mudry, Marta D. 2016. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, [s.l.], v. 179, p.29-36. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.003>.

Raphael, Bonnie L. *et al.* 1994. Blood Values in Free-Ranging Pancake Tortoises (*Malacochersus tornieri*). Journal Of Zoo And Wildlife Medicine, Yulee, v. 25, n. 1, p.63-67. Disponível em: <Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/20095335>>. Acesso em: 12 maio 2018.

Reguera, Senda *et al.* 2015. Ultraviolet radiation does not increase oxidative stress in the lizard *Psammmodromus algirus* along an elevational gradient. Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, [s.l.], v. 183, p.20-26. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.12.015>.

Russell, Ronald W.; Gobas, Frank A. P. C.; Haffner, G. Douglas. 1999. Maternal Transfer and in Ovo Exposure of Organochlorines in Oviparous Organisms: A Model and Field Verification. Environmental Science & Technology, [s.l.], v. 33, n. 3, p.416-420. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es9800737>.

São Paulo. Cláudio A. Spadotto. Embrapa (Comp.). 2004. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente: Documentos 42, Jaguariúna, p.1-29.

Serra, Letícia Silva et al., 2016 Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da Undb, São Luis, p.2-25, jul.

Schaumburg, Laura G. *et al.* 2016. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. Pesticide Biochemistry And Physiology, [s.l.], v. 130, p.71-78. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.11.009>.

Silva, Wellington Bandeira da *et al.* 2010. Bioquímica plasmática de cascavéis (*Caudisona durissa* LINNAEUS, 1758) em cativeiro. *Ciência Rural*, [s.l.], v. 40, n. 12, p.2510-2514. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782010001200012>.

Soares, Wagner Lopes; Porto, Marcelo Firpo, 2007. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. *Ciências e Saúde Coletiva*, São Paulo, v. 1, n. 12, p.131-143.

Sousa, Bernadete Maria *et al.* 2010. Répteis em fragmentos de Cerrado e Mata Atlântica no Campo das Vertentes, Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, [s.l.], v. 10, n. 2, p.129-138. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-06032010000200016>.

Spadotto, Cláudio A. 2006. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*, São Manuel, p.1-9. Disponível em: <http://www.fan.edu.br/npi_2.php. 9p.>. Acesso em: 10 maio 2018.

Speakman, John R. 2008. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363, 375–398.

Sykes, John M.; Klaphake, Eric. 2015. Reptile Hematology. *Clinics In Laboratory Medicine*, [s.l.], v. 35, n. 3, p.661-680. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.014>.

Thrall M.A. *et al.* 2015. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349 a 360.

UFRGS. Localização EEA. <http://www.ufrgs.br/agronomia/joomla/index.php/eea-localizacao>. (Acessado em 10 maio 2018)

UFRGS. Apresentação. <http://www.ufrgs.br/agronomia/joomla/index.php/eea-apresentacao> (Acessado em 10 maio 2018).

Van Sluys, Monique. 1993. Food Habits of the Lizard *Tropidurus itambere* (Tropiduridae) in Southeastern Brazil. *Journal Of Herpetology*, [s.l.], v. 27, n. 3, p.347-351. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/1565162>.

Viana, Diego Carvalho *et al.* 2014. Perfil bioquímico em serpentes - revisão de literatura. *Rev. Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias*, São Luís, v. 9, n. 1, p.56-61.

Vieira, Renata C. *et al.* 2015. Approaches to capturing the Black and White Tegu *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). *Zoologia (curitiba)*, [s.l.], v. 32, n. 4, p.317-320. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-46702015000400007>.

Vieira, Renata Cardoso. 2016. História natural, ecologia populacional e genética de *Salvator merianae* (Duméril e Bibron, 1839) (Squamata, Teiidae) no sul do Brasil. 170 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Animal, Ufrgs, Porto Alegre.

Vitt, Laurie *et al.* 2008. Guide to the lizards of Reserva Adolpho Ducke - Central Amazonia. Manaus: Attema Designe Editorial. 175 p.

Wagner, Norman *et al.* 2015. Risk evaluation of pesticide use to protected European reptile species. *Biological Conservation*, [s.l.], v. 191, p.667-673. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.08.002>.

Weir, Scott M. *et al.* 2015. Improving reptile ecological risk assessment: Oral and dermal toxicity of pesticides to a common lizard species (*Sceloporus occidentalis*). *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1778-1786. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2975>.

Wilkens, A.L.L., Valgas, A.A.N., Oliveira, G.T., 2019. 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05533-z>.

Wang, Zikang *et al.* 2019. Stereoselective metabolism and potential adverse effects of chiral fungicide triadimenol on *Eremias argus*. *Environmental Science And Pollution Research*, [s.l.], p.1-12. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-07205-4>.

Winck, Gisele Regina. 2007. História natural de *Tupinambis merianae* (Squamata, Teiidae) na Estação Ecológica do Taim, extremo sul do Brasil. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Zena, Lucas A. *et al.* 2019. Seasonal changes in plasma concentrations of the thyroid, glucocorticoid and reproductive hormones in the tegu lizard *Salvator merianae*. *General And Comparative Endocrinology*, [s.l.], v. 273, p.134-143. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.06.006>

Zhang, Yang *et al.* 2015. Oxidative stress and antioxidant status in a lizard *Phrynocephalus vlangalii* at different altitudes or acclimated to hypoxia. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [s.l.], v. 190, p.9-14. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.013>.

APÊNDICE

Tabela 5. Resumo da média de valores obtidos para análises de dano hepático em *Salvator merianae*. Foi utilizado um N de 9 para área de referência e 3 animais em área exposta para fosfatase alcalina e albumina, 8 na área de referência e 3 na exposta para alanina aminotransferase e Gama GT para juvenis. Para machos, foi utilizado um N de 5 para área de referência e 4 animais em área exposta para fosfatase alcalina e albumina, 4 na área de referência e exposta para Gama GT, 5 na área de referência e 4 na exposta para alanina aminotransferase. Já para fêmeas, um N de 4 para área de referência e 3 animais em área exposta para fosfatase alcalina e albumina, 3 na área de referência e exposta para Gama GT, 4 na área de referência e 3 na exposta para alanina aminotransferase. Valores diferenciados ocorreram por não ter amostras suficientes. As barras representam as médias \pm erro padrão

Parâmetros	Danos hepáticos					
	Juvenis		Machos		Fêmeas	
	Referência	Exposta	Referência	Exposta	Referência	Exposta
FAL (U/L)	298,14 \pm 27,04 P=0,46	309,77 \pm 26,36	363,12 \pm 57,31 P=0,13	209,66 \pm 34,48	277,1 \pm 48,08 P=0,43	237,09 \pm 48,63
ALT (U/L)	40,61 \pm 6,33 P=1,00	36,56 \pm 6,95	42,55 \pm 7,56 P=0,42	44,56 \pm 18,50	150,98 \pm 97,55 P=0,61	46,23 \pm 14,07
Gama GT (U/L)	13,53 \pm 3,92 P=0,43	4,86 \pm 0,67	13,51 \pm 2,16 P=0,64	14,99 \pm 4,20	5,21 \pm 1,44 P=0,07	10,03 \pm 1,80
ALB (mg/mL)	11,09 \pm 2,24 P=0,38	7,73 \pm 3,61	15,95 \pm 4,68 P=0,89	14,65 \pm 4,57	9,14 \pm 4,65 P=0,12	17,25 \pm 2,49

Tabela 6: Resumo da média de valores obtidos para análises de metabolismo intermediário e endócrino em *Salvator merianae*. Um N de 9 animais juvenis foram usados na área de referência e 3 na exposta. Para machos, foi utilizado um N de 5 animais na área de referência e 4 na área exposta. Para fêmeas foi utilizado um N de 4 animais na área de referência e 3 na área exposta. As barras representam as médias \pm erro padrão

Parâmetros Plasmáticos	Metabolismo intermediário e endócrino					
	Juvenis		Machos		Fêmeas	
	Referência	Exposta	Referência	Exposta	Referência	Exposta
PT (mg/mL)	19,95 \pm 1,43 P=0,08	15,78 \pm 1,57	20,44 \pm 3,54 P=0,46	17,62 \pm 2,81	16,63 \pm 2,96 P=0,03	25,89 \pm 2,66
AU (mg/mL)	2,84 \pm 0,39 P<0,05	1,40 \pm 0,14	1,80 \pm 0,48 P=0,31	1,90 \pm 0,31	2,12 \pm 0,15 P=0,20	3,86 \pm 0,80
GLI (mmol/L)	25,3 \pm 1,23 P=0,35	26,89 \pm 2,37	20,99 \pm 1,55 P=0,006	27,13 \pm 2,03	24,63 \pm 2,9 P=0,45	29,8 \pm 4,62
TGL (mg/dL)	69,59 \pm 15,54 P=0,02	10,96 \pm 1,68	57,18 \pm 11,83 P=0,59	94,20 \pm 26,21	234,55 \pm 94,63 P=0,77	407,23 \pm 186,11
VLDL (mg/dL)	13,91 \pm 3,10 P=0,02	2,19 \pm 0,33	11,43 \pm 2,36 P=0,59	18,84 \pm 5,24	46,91 \pm 18,92	81,44 \pm 37,22 0,77
Corticosterona (ng/mL)	31,57 \pm 1,73 P=0,58	25,49 \pm 4,85	37,64 \pm 0,65 P=0,17	27,60 \pm 3,75	35,83 \pm 1,90 P=0,41	38,96 \pm 0,56

Tabela 7: Resumo dos resultados de estresse oxidativo representados pela média de valores obtidos para eritrócitos de *Salvator merianae* coletados fora do período de hibernação. Para tanto, foram utilizados um N de 9 animais para a área de referência e 3 para área exposta de juvenis, 5 para área de referência e 4 para exposta de machos, e 4 na área de referência e 3 na exposta de fêmeas. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão

Parâmetros	Estresse Oxidativo					
	Juvenis		Machos		Fêmeas	
	Referência	Exposta	Referência	Exposta	Referência	Exposta
PT (mg.ml ⁻¹)	37,65±4,04 P=0,039	24,07±2,73	26,55±4,68 P=0,02	37,26±3,22	28,64±4,20 P=0,52	30,21±3,05
TBARS (µmoles/mg)	7,53±1,29 P=0,0001	19,21±2,42	6,59±1,43 P=0,95	5,93±1,58	11,57±3,50 P=0,34	5,49±1,50
SOD (U.mg de proteínas ⁻¹)	3,02±0,37 P=0,39	3,94±0,97	7,15±1,95 0,004	2,05±0,41	4,62±63,59 P=0,002	2,3625±0,29
CAT (pmoles.mg proteínas ⁻¹ .min ⁻¹)	47,27±7,02 P=0,31	92,26±33,26	84,37±29,17 0,02	34,55±14,63	63,99±18,64 P=0,66	46,23±11,24
GST (µmoles.mg proteínas [†] .min ⁻¹)	7,09±0,66 P=0,01	11,99±1,75	13,75±1,89 0,0004	5,72±0,79	9,18±0,76 P=0,72	10,32±1,94



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br