

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)**

**LETÍCIA SELINGER GALANT**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815)  
DE LAVOURAS DE ARROZ IRRIGADO, NO SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

**Criciúma, SC,**

**2013**

**LETÍCIA SELINGER GALANT**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815)  
DE LAVOURAS DE ARROZ IRRIGADO, NO SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para a obtenção do grau de Bacharel no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Zocche

Co-orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

**Criciúma, SC  
2013**

**LETÍCIA SELINGER GALANT**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815)  
DE LAVOURAS DE ARROZ IRRIGADO, NO SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso, aprovado pela Banca Examinadora para a obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Criciúma, 27 de junho de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Jairo José Zocche – Doutor – UNESC

Prof (a). Fabrícia Petronilho – Doutora – UNISUL

Prof. Claudio Ricken – Mestre - UNESC

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, por permitir que meus sonhos fossem encaminhados e que todas as barreiras durante a minha caminhada fossem desfeitas, me sentindo forte e capaz de seguir em frente.

A toda minha família em especial meus pais, Vânio e Dalva que sempre me deram apoio e coragem para seguir, nos momentos mais difíceis sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

À minha irmã Kênia e seu marido Tiago que sempre estiveram dispostos em me acompanhar em alguns campos.

Ao Gustavo grande amigo e namorado que sempre aguentou minhas crises de choro, com sua invejável paciência e carinho me incentivando nesses últimos quatro anos.

Às pestinhas Clarice e Nicole, sobrinhas que amo muito, que nas tardes dos finais de semana sempre me divertiram com suas molecadas.

Ao Professor Dr. Jairo José Zocche pela sua contribuição com seus grandes conhecimentos, como professor e orientador, além de sua grande dedicação ao meu trabalho.

Ao meu co-orientador professor Dr. Felipe Dal-Pizzol, que abriu as portas para meu conhecimento científico em seu laboratório de Fisiopatologia Experimental, e também claro pela ajuda e confiança depositada neste trabalho.

À colega Poliana que sempre esteve disposta a ajudar nos campos teve grande dedicação na realização deste trabalho.

Às minhas parceiras de experimentos Rê, Nati e Monique que entre tapas e beijos sempre estiveram juntas comigo.

Às minhas colegas de laboratório Dhébora e Fran Vuolo pela eterna disposição e dedicação na elucidação de todas minhas dúvidas.

E a todos os amigos e colegas de graduação do curso de Ciências Biológicas.

## RESUMO

Os anfíbios são muito susceptíveis a danos provocados por agrotóxicos, pelo fato deste grupo viver o maior tempo de sua vida em ambientes aquáticos e a sua pele ser altamente permeável e muito sensível a produtos químicos. Estudos mostram que ovos e larvas de anfíbios têm se revelado extremamente sensíveis aos efeitos dos metais e da poluição. Os agrotóxicos parecem contribuir para o estresse oxidativo em modelos animais. As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidas nos organismos, por fontes exógenas como a radiação, os agrotóxicos e a poluição ambiental. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência de estresse oxidativo em diferentes tecidos (pulmão, fígado, rins e músculo) de *Leptodactylus latrans* em lavoura de arroz com uso de agrotóxicos, comparando com áreas controles, bem como os tecidos que mais sofreram estresse oxidativo. As capturas dos animais foram realizadas em quatro áreas: plantação de arroz irrigado com uso de agrotóxico Treze de Maio, Santa Catarina (grupo teste) e em três áreas úmidas de restinga da planície costeira do sul de Santa Catarina (grupo controle). Foram capturados machos e fêmeas entre 30 e 60 gramas e retiradas às estruturas para análises de estresse oxidativo em lipídeos (TBARS) e proteínas (Carbonil). Dosagens de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram realizadas. A espécie *L. latrans* foi analisada no todo (machos e fêmeas) e animais machos foram separados nos testes estatísticos (teste t *student*), sendo valor de  $p < 0,05$  considerado significativamente estatístico. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de TBARS de animais expostos aos agrotóxicos nos tecidos renal e muscular; quando separados animais machos foi observado também no tecido pulmonar. Níveis de Carbonil não foram significativos em animais expostos aos agrotóxicos quando comparados ao grupo controle, apesar da tendência ao aumento. A atividade de SOD diminuiu no tecido renal de animais expostos aos agrotóxicos e tecidos renal e muscular quando foram separados animais machos do mesmo grupo. A atividade de CAT aumentou no tecido hepático de animais expostos aos agrotóxicos. Os resultados do presente estudo oferecem dados sobre o estresse oxidativo ocorridos em pelo menos dois tecidos da espécie *Leptodactylus latrans* em áreas de lavouras de arroz contaminadas pelo uso de agrotóxico, bem como a diferença dos efeitos oxidativos em animais machos. O tecido hepático se mostrou adaptado ao estresse oxidativo, mostrando que tecidos diferem no que diz respeito à capacidade de defesa contra o estresse oxidativo induzido por poluentes. *Leptodactylus latrans* mostra-se um bom bioindicador de impacto ambiental provocado por agrotóxicos e água contaminada.

**Palavra chave:** Anfíbios; agrotóxicos; lavoura de arroz; estresse oxidativo.

## LISTA DE FIGURA

Figura 1 - <i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen, 1815).....	10
Figura 2 - Mapa de localização do município de Treze de Maio, Santa Catarina. ....	18
Figura 3 - Cultivo de arroz irrigado no município de Treze de Maio, Santa Catarina, (A) córrego que irriga a lavoura e (B, C, D) área de cultivo de arroz. ....	18
Figura 4 - Localização dos municípios de Laguna, Jaguaruna e Balneário Arroio do Silva, Santa Catarina. ....	20
Figura 5 - Áreas controle (A) Laguna, (B) Jaguaruna, (C e D) Balneário Arroio do Silva. ....	20
Figura 6 - Procedimentos para as retiradas de amostras de <i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen, 1815), (A) macho e (B) fêmea. ....	22
Figura 7- Níveis de peroxidação lipídica em fígado, pulmão, rim e músculo de <i>L. latrans</i> (machos e fêmeas) Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=20). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	25
Figura 8 - Níveis de peroxidação lipídica em fígado, pulmão, rim e músculo de <i>L. latrans</i> (machos) Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=9). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	26
Figura 9 - Níveis de proteínas carboniladas em fígado, pulmão, rim e músculo de <i>L. latrans</i> (machos e fêmeas) Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=20). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	27
Figura 10 - Níveis de proteínas carboniladas em fígado, pulmão, rim e músculo de animais machos de <i>L. latrans</i> . Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=9). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	27
Figura 11 - Atividade da enzima superóxido dismutase em fígado, pulmão, rim e musculo de <i>L. latrans</i> . Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=20). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	28
Figura 12 - Atividade da enzima SOD em fígado, pulmão, rim e músculo de animais machos de <i>L. latrans</i> . Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=9). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	29
Figura 13 - Atividade da enzima catalase em fígado, pulmão, rim e músculo de <i>L. latrans</i> . Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=20). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	30
Figura 14 - Atividade da enzima catalase em fígado, pulmão, rim e músculo de animais machos de <i>L. latrans</i> . Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=9). * mostra resultados significativos pelo <i>test t student</i> para valores de $p < 0.05$ . ....	30

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.2 ANFÍBIOS .....	8
<b>1.2.1 Família Leptodactylidae Werner, 1896</b> .....	<b>9</b>
1.2.1.2 <i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen, 1815) .....	9
1.3 AGROTÓXICOS EM LAVOURAS DE ARROZ.....	10
<b>1.3.1 Ricer – Penoxsulam</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.2 Veget’oil – Óleo vegetal</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.3 Basagran 480 – Bentazona</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.4 Decis 25 EC – Deltametrina</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3.5 Piori – Azoxistrobina</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3.6 Score - Difenoconazol</b> .....	<b>13</b>
1.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO .....	13
<b>1.4.1 Peroxidação Lipídica</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4.2 Dano oxidativo em proteínas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4.3 Defesas antioxidantes</b> .....	<b>15</b>
1.5 OBJETIVOS .....	16
<b>1.5.1 Objetivo geral</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 AREAS DE ESTUDO .....	17
<b>2.1.1 Lavoura de arroz irrigado e com uso de agrotóxicos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.2 Área controle</b> .....	<b>19</b>
2.2 COLETA DOS ANIMAIS .....	21
2.3 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	22
<b>2.3.1 Medidas de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3.2 Medida de dano oxidativo em proteínas</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.4 Determinação de proteínas</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.5 Análise estatística</b> .....	<b>23</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 DANOS OXIDATIVOS .....	25
3.2 ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	28
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.2 ANFÍBIOS

Anfíbios colonizaram a terra por cerca de 350 milhões de anos atrás e evoluíram uma variedade de aspectos morfológicos e ecológicos. Os anfíbios são divididos em três grupos vivos: as rãs, salamandras e cecílias. Contendo mais de 3.900 espécies vivas e novas espécies estão sendo descobertas a cada ano (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

Distribuídos por todos os cinco continentes, os anfíbios vivem em ecossistemas de água doce e terrestres, ocupando uma grande variedade de habitats, havendo espécies semi-aquáticas, aquáticas, terrestres, fossórias e arborícolas. A maioria dos anfíbios depende do ambiente aquático para o seu desenvolvimento durante as fases embrionária e larval, e também para suprir as suas necessidades fisiológicas e metabólicas depois de adultos (LOEBMANN, 2005). Alimentam-se principalmente de insetos, aranhas e pequenos vertebrados inclusive de outros anfíbios (MACHADO; BERNARDE, 2006).

Vários estudos vêm mostrando o declínio e extinção de anfíbios nos cinco continentes sendo as causas sugeridas para este declínio a destruição de ambientes, alterações na disponibilidade e na qualidade de corpos da água, a introdução de predadores, a poluição por pesticidas, a chuva ácida, a variação climática, desmatamento, urbanização, queimadas e conseqüentemente o aumento do nível de radiação de alta energia pela camada de ozônio (BASTOS et al., 2003; LOEBMANN, 2005).

Alguns estudos mostram a baixa riqueza e abundância de espécies em áreas de maior impacto ambiental, como por exemplo, em área de extração de carvão (LUCCA, 2009). Outros estudos utilizando a espécie *Hypsiboas faber*, apresentaram dano em DNA assim como a acumulação de metais pesados em área contaminada por carvão (ZOCHE, 2013). Apesar do impacto que as áreas de mineração de carvão do sul de Santa Catarina exercem sobre os anfíbios, poucos estudos foram realizados, podendo ser citados Mendonça et al. (2008), Zocche et al. (2012) e Zocche et al. (não publicado).

Outros autores como Peltzer et al., (2001) revelam que a utilização de determinados inseticidas na agricultura tem ocasionado deformidades em algumas espécies de anfíbios. A contaminação da água pode ser um dos motivos dessas deformidades (BASTOS et al., 2003). Os anfíbios são considerados indicadores de qualidade ambiental e a presença de

determinadas populações tem sido sugeridas como objeto de estudo na formação de planos de manejo e conservação de ecossistemas terrestres e aquáticos (BEISWENGER, 1988).

O acúmulo de bioácidas e o efeito tóxico de metais tem sido uma grande ameaça para a sobrevivência de todos os grupos animais em especial a população de anfíbios. Isso ocorre porque os ovos e as larvas de anfíbios têm se revelado extremamente sensíveis aos efeitos dos metais e da poluição (LOEBMANN, 2005).

### **1.2.1 Família Leptodactylidae Werner, 1896**

A família Leptodactylidae é a maior família de anuros sendo composta por 51 gêneros e aproximadamente 1.090 espécies, que ocorrem desde a América do Sul até a América do Norte, estando presentes também nas Índias Ocidentais (LIMA et al., 2005). Os leptodactídeos são extremamente variáveis no tamanho (com espécies de 12 até 250 mm de comprimento), estrutura, aparência, assim como hábitos de vida, podendo algumas espécies ser aquáticas, arborícolas ou terrestres (DEIQUES et al., 2007).

#### **1.2.1.2 *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815)**

Popularmente conhecida como rã manteiga a espécie *Leptodactylus latrans* é muito frequente na região sul, sudeste, nordeste, centro-oeste e norte do Brasil, podendo ser encontrada no Paraguai, Argentina e Uruguai (DEIQUES et al., 2007). O tamanho aproximado é de 140 mm para o macho e 120 mm para a fêmea, possui o dorso com quatro ou cinco pregas longitudinais de coloração-avermelhada ou cinzenta com mancha triangular entre os olhos, a coloração ventral é esbranquiçada com manchas irregulares, os olhos são laterais com pupila horizontal (Figura 1). Machos possuem braços bem desenvolvidos e duas espinhas córneas em seu primeiro dedo (LOEBMANN, 2005; DEIQUES et al., 2007).

Habitam ambientes aquáticos de pequena profundidade, pântanos e arroios em áreas abertas, nos meses mais frios são encontradas embaixo de pedras e troncos. A alimentação é constituída por insetos, larvas e em menor frequência outros anuros. A época reprodutiva ocorre nos meses de setembro a fevereiro, os machos vocalizam ao dia e a noite, o canto é composto de notas curtas, graves e de baixa frequência (ACHAVEL; OLMOS, 2009). O acasalamento é denominado amplexo que significa abraço, onde o macho se posiciona sobre a fêmea abraçando-a. As fêmeas têm cuidado parental por até 60 dias, posicionando-se

na parte central do ninho após a desova e desloca-se para cuidar dos girinos, atacando possíveis agressores (LOEBMANN, 2005). *L. latrans* é uma espécie que resiste a alterações ambientais produzidas pelo homem, seus girinos parecem suportar graus de poluição, que normalmente não são aceitáveis por outros anuros, fazendo com que esta espécie seja muito comum em lugares poluídos e habitados por homens (IZECKSOHN; CARVALHO, 2001).

Figura 1 - *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815).



Fonte: Haddad (2008)

### 1.3 AGROTÓXICOS EM LAVOURAS DE ARROZ

Agrotóxicos são considerados toxinas utilizadas para afastar, controlar e matar organismos indesejados nas lavouras. São agrupados de acordo com o que é desejado combater, sendo herbicidas (para combater plantas daninhas), fungicidas (combater fungos), inseticidas (para insetos) entre outros pesticidas (MEIRELLES et al., 1991; VAZ, 2006).

Os agrotóxicos podem contaminar o ar, solo, águas superficiais e subterrâneas, acabam se acumulando em organismos da cadeia biológica, e podem causar danos em animais silvestres e até em humanos (MEIRELLES et al., 1991).

Os herbicidas, inseticidas e fungicidas também são utilizados na cultura de arroz irrigado. Na maior parte das lavouras do sul do Brasil, as aplicações dos agrotóxicos são seguidas pela inundação das lavouras (RESGALLA et al., 2002), o que deixa os organismos aquáticos e semi-aquáticos expostos a ação direta dos mesmos. Existem compostos organofosforados e organoclorados muito utilizados na cultura de arroz irrigado, esses compostos são altamente nocivos e persistentes no meio ambiente, sendo os organoclorados

bioacumulativos (COPATTI, 2009; RUEGG et al., 1991). Os agrotóxicos estão classificados em extremamente, altamente, mediamente ou pouco tóxicos, em função da sua toxicidade à saúde humana e ao grau de impacto ao ambiente (VAZ, 2006).

Entre os agrotóxicos indicados para o uso agrícola em lavoura de arroz, podem ser citados: Ricer – Penoxsulam, Veget’oil – Óleo vegetal, Basagran 480 – Bentazona, Decis 25 EC – Deltametrina, Priori – Azoxistrobina, Score – Difenconazol, estes agrotóxicos possivelmente são encontrados na lavoura em estudo.

### **1.3.1 Ricer – Penoxsulam**

Agroquímico de classificação toxicológica II (altamente tóxico), e classificação ambiental III (perigoso ao meio ambiente). Do grupo químico Sulfonanilida Triazolopirimidina, composição química 3-(2,2-difluoroethoxy)-N-(5,8-dimethoxy, triazolo, pyrimidin-2-yl)-a,a,a-trifluorotoluene-2-sulfonamide, em plantas possui ação inibitória da enzima acetolactato sintase (ALS), básica para biogênese de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (CONCENÇO et al., 2006). É recomendado para o controle de plantas infestantes (gramíneas) e ciperáceas na cultura de arroz irrigado. É considerado altamente móvel, apresentando potencial de deslocamento no solo. Pode agir em águas subterrâneas, sendo também altamente tóxico para algas. Os efeitos crônicos observados em camundongos expostos por dezoito meses a doses de até 759 mg/kg peso corporal/dia foram o aumento dos pesos relativos e absolutos do fígado, hipertrofia com alteração da mancha citoplasmática dos hepatócitos e preenchimento da lacuna do parênquima com sangue do fígado (DOWAGRO, 2013).

### **1.3.2 Veget’oil – Óleo vegetal**

Inseticida do grupo químico dos ésteres dos ácidos graxos, emulsificante de classificação ambiental IV (pouco perigoso ao meio ambiente) (OXIQUIMICA, 2013).

### **1.3.3 Basagran 480 – Bentazona**

Herbicida do grupo químico Benzotiadiazinona, sua composição química 3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4 (3H)-one-2,2-dioxide. Apresenta classificação

toxicológica I (extremamente tóxico) e classificação ambiental III (perigoso ao meio ambiente). É altamente persistente e móvel, em plantas atua na superfície foliar, paralisando a fotossíntese levando, conseqüentemente, a planta à morte. Espécies de ciperáceas, algumas monocotiledôneas e muitas dicotiledôneas são susceptíveis a este produto. Efeitos crônicos em animais de laboratório mostraram que nas doses mais altas os efeitos toxicológicos foram: desidratação, diminuição do peso, alterações hematológicas, inflamação intestinal, aumento do peso do rim (BASF, 2013).

#### **1.3.4 Decis 25 EC – Deltametrina**

Inseticida do grupo piretróide, composição química (S)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate. De classificação toxicológica III (altamente tóxico) e classificação ambiental I (altamente perigoso ao meio ambiente). Altamente bioconcentrável em peixes, tóxico para organismos do solo, algas e microcústáceos. Animais de laboratório expostos apresentaram efeitos crônicos como dermatite e alergias respiratórias. Efeitos específicos por piretróides sintéticos são neurotóxicos e interagem com canais de sódio (BAYER, 2013).

#### **1.3.5 Piori – Azoxistrobina**

Fungicida sistêmico do grupo químico Estrobilurina de classificação toxicológica III (mediamente tóxico) e classificação ambiental III (perigoso ao meio ambiente). Composição química Methyl(E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate. Fungicida que inibe o transporte de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c1 na cadeia respiratória mitocondrial, perturbando a produção de ATP (BEZERRA, 2007). Estudos sobre os efeitos crônicos em animais de laboratório, com o tratamento de azoxistrobina na dieta, mostraram que o fígado foi considerado o órgão alvo, havendo hiperplasia epitelial ou ulceração do ducto biliar e hiperplasia biliar do fígado. As alterações no fígado foram consideradas como secundárias para a toxicidade do ducto biliar (SYNGENTA, 2013a).

### 1.3.6 Score - Difenconazol

Fungicida sistêmico do grupo químico Triazol, composição química cis-trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether, classificação toxicológica I (extremamente tóxico) e classificação ambiental II (muito perigoso ao meio ambiente). Atua na inibição da demetilação durante síntese de ergosterol, um componente crítico para a integridade das membranas fúngicas. Em animais é um indutor do sistema enzimático hepático citocromo P450, e inibidor da atividade aromatase (enzima responsável pela conversão da testosterona e androestenediona em esteróides sexuais femininos como o estradiol). O principal modo de ação tóxica é a depressão do sistema nervoso central. Estudos crônicos de animais de laboratório mostraram uma diminuição no ganho de peso e toxicidade hepática e renal, após tratamento com difenoconazol, e em altas concentrações causou toxicidade materna. É considerado possível carcinogênico em humanos (SYNGENTA, 2013b).

É válido ressaltar que existem agrotóxicos que são vendidos ilegalmente no Brasil, eles são adquiridos sem o receituário agrônomo, e muitos agricultores aplicam doses acima das recomendadas pelo fabricante, o que pode contribuir para o aumento da contaminação ambiental (FRAGA, 2012).

## 1.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres (RLs) são definidos como átomos ou grupo de átomos com um elétron não-pareado na sua última camada de valência, sendo eles altamente reativos com outras moléculas. Alguns exemplos de radicais livres encontrados em organismos são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila (OH $\cdot$ ). Os radicais livres possuem um tempo de meia vida curto, devido à instabilidade eletrônica que apresentam, resultando na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a formar outros radicais (PEREIRA, 1996).

Outras substâncias como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), não possuem elétron não pareado na última camada, porém são altamente reativas como os radicais livres. Essas substâncias são classificadas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), (DROGE, 2002).

As EROs podem ser produzidas nos organismos, por fontes exógenas como a radiação, os agrotóxicos, os medicamentos, a poluição ambiental, ou por fontes endógenas como a degradação de ácidos graxos e a oxidação de pequenas moléculas entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Ao longo da cadeia transportadora de elétrons, as EROs podem ser geradas por erros no processo de redução univalente do oxigênio, dentre eles o  $O_2^-$ ,  $OH^-$  e o  $H_2O_2$  (AMES et al., 1993), as quais são altamente prejudiciais às células biológicas.

Nas células, o  $O_2^-$  é formado a partir do oxigênio por diferentes mecanismos, podendo reagir com o nitrosonium ( $NO^+$ ), gerando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que é neurotóxico, ou pode ser convertido por enzimas em  $H_2O_2$  que, na presença de íons como o cobre ou ferro, dá origem ao  $OH^-$  que é extremamente tóxico (VERONESI et al., 2002).

As EROs estão balanceadas com defesas antioxidantes. Essas defesas podem ser enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX). Quando estas enzimas estão em menor quantidade nos organismos algumas biomoléculas podem sofrer dano e não serem mais reparadas (VALKO et al., 2006). Um distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, gera o estresse oxidativo, o que pode resultar em adaptação ou lesão celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos são alvos celulares dos danos oxidativos, podendo alterar as propriedades físicas e químicas das membranas celulares, modificando a sua fluidez e permeabilidade e, conseqüentemente, levando a morte celular (VASCONCELOS et al., 2007).

#### **1.4.1 Peroxidação Lipídica**

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A reação das espécies ERO ou ERN com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001)

As propriedades das membranas biológicas podem ser alteradas pela ação dos radicais livres, pela formação de ligações cruzadas por reações de terminação radical-radical

entre lipídio-lipídio e lipídio proteína, assim como o encurtamento das cadeias lipídicas por processos degradativos que levam a um aumento da rigidez das membranas celulares (BARBOSA, 2008).

A peroxidação de lipídios está relacionada com efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, injúrias nos tecidos e no desenvolvimento de doenças (DAL-PIZZOL et al., 2000).

#### **1.4.2 Dano oxidativo em proteínas**

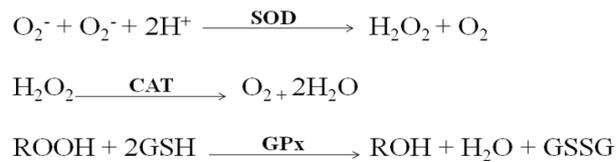
As proteínas estão presentes em altas concentrações nos sistemas biológicos, e seus aminoácidos são altamente suscetíveis a oxidação. Os aminoácidos como arginina, cisteína, prolina, metionina são altamente sensíveis ao radical  $\text{OH}^\cdot$ . A oxidação de aminoácidos leva a carbonilação, fragmentação, cross-linking, agregação protéica e consequentemente perda de função e proteólise (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999; VALKO et al., 2006).

A oxidação de proteínas em sistemas biológicos pode levar a indução de dano ao DNA e nos processos de sinalização celular (ROSEIN et al., 2006). A ação das ERO e ERN pode ser responsáveis pela mutação ou mesmo oncogênese sobre o DNA (BARREIROS et al., 2006) e os grupos carbonil têm sido utilizados para a avaliação de danos em proteínas (POSSAMAI et al., 2007).

#### **1.4.3 Defesas antioxidantes**

Com os efeitos danosos das EROs e ERNs as células apresentam enzimas específicas que atacam diretamente as EROs, formando produtos menos agressivos, as principais enzimas antioxidantes são: SOD, CAT e GPX (MICHIELS et al., 1994).

A SOD converte o  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio molecular, enquanto CAT atua com a GPX não permitindo a produção  $\text{OH}^\cdot$  a partir do peróxido de hidrogênio (MICHIELS et al., 1994; RITTER, 2003).



A atuação destas enzimas é de extrema importância para a proteção celular contra o estresse oxidativo. O desequilíbrio entre as enzimas aumenta o estresse oxidativo, com consequente dano celular, participando da gênese de doenças (DAL-PIZZOL et al., 2003).

Os agrotóxicos parecem contribuir para o estresse oxidativo em modelos animais (POSSAMAI et al., 2007; BAINY et al., 1996; DORVAL, et al., 2005).

Em geral os anfíbios são muito susceptíveis a danos provocados por agrotóxicos, pelo fato deste grupo viver o maior tempo de sua vida em ambientes aquáticos e a sua pele ser altamente permeável e muito sensível a produtos químicos.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar o impacto do uso de agrotóxicos em lavoura de arroz irrigado sobre *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) por meio de bioensaios.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a ocorrência de estresse oxidativo em diferentes órgãos das rãs *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) que habitam área de lavoura de arroz com uso de agrotóxico.
- ✓ Comparar os níveis de estresse oxidativo registrados em machos e fêmeas de *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) que habitam área de lavoura de arroz com uso de agrotóxico.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AREAS DE ESTUDO

O presente trabalho foi desenvolvido em dois ambientes distintos: lavoura de arroz irrigado, onde se usa agrotóxicos e, áreas naturais livre da influência de agrotóxicos, tendo como espécie alvo *Leptodactylus latrans*. As capturas dos animais foram realizadas em quatro áreas: plantação de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) localizada no município de Treze de Maio, SC (grupo teste) (Figuras 2 e 3) e em três áreas úmidas de restinga da planície costeira do sul de Santa Catarina (grupo controle) (Figuras 4 e 5). O controle foi constituído de três áreas, pois não foi possível capturar o número mínimo necessário de espécimes em apenas um local.

#### 2.1.1 Lavoura de arroz irrigado e com uso de agrotóxicos

A lavoura de arroz irrigado ocupa uma área de 12 hectares, onde o cultivo com a aplicação de agrotóxicos vem sendo realizado há mais de 10 anos. A água que inunda esta lavoura passa por outras duas plantações de arroz que também utilizam agrotóxicos. O uso de agrotóxicos foi constatado por meio de uma entrevista direta com o proprietário da área.

Treze de Maio é um município localizado no sul de Santa Catarina (28°33'32"S e 49°08'52"O), na microrregião da AMUREL, a 165 km de Florianópolis.

O clima da região Sul de Santa Catarina é classificado segundo Köppen (1948) como o tipo climático Cfa, com média pluviométrica anual de 1983 mm, ocorrendo o período mais chuvoso de dezembro a fevereiro e o menos chuvoso de abril a julho. A temperatura média anual para a área oscila entre 17 e 19,3°C, com máximas de 23,4 a 25,9°C e mínimas de 12 a 15°C (EPAGRI, 2001).

Figura 2 - Mapa de localização do município de Treze de Maio, Santa Catarina.



Fonte: Abreu (2006)

Figura 3 - Cultivo de arroz irrigado no município de Treze de Maio, Santa Catarina, (A) córrego que irriga a lavoura e (B, C, D) área de cultivo de arroz.



Fonte: Do autor (2013)

Segundo dados da EPAGRI (2001), o solo é considerado Podzólico Vermelho-Amarelo Álico e Distrófico Tb. A moderada textura médio-argilosa fase floresta tropical perenifólia relevo suave ondulado. As principais limitações ao uso agrícola dizem respeito à baixa fertilidade natural e aos elevados teores de alumínio trocável. As propriedades físicas e de relevo favoráveis fazem com que estes solos apresentem boas condições de utilização, tanto para lavouras quanto para usos menos intensivos, desde que devidamente corrigidos e adubados, além de cuidados especiais quanto à erosão.

Treze de Maio possui uma área territorial de 161,08 Km<sup>2</sup>, (EPAGRI, 2005) sendo que 984 ha correspondem à área total do cultivo de arroz do município em 2011, com uma produção de 6.396 toneladas de arroz em casca (IBGE, 2013).

### **2.1.2 Área controle**

As coletas dos animais do grupo controle foram executadas em três áreas úmidas, livres da influência da cultura de arroz irrigado com o uso de agrotóxicos, em ambientes de restinga. Estas áreas se encontram nos municípios de Laguna na localidade de Ponta da Barra, Jaguaruna, na praia do Camacho e em Balneário Arroio do Silva (Figuras 4 e 5).

A área de coleta no município de Laguna se localiza nas coordenadas 28° 30'18 S e 48° 45'17 O, na Ponta da Barra, a do município de Jaguaruna nas coordenadas 28° 37'22 S e 48° 53'05 O, na Praia do Camacho e no município de Balneário Arroio do Silva 29° 00'08 S e 49° 26'43 O.

Figura 4 - Localização dos municípios de Laguna, Jaguaruna e Balneário Arroio do Silva, Santa Catarina.



Fonte: Abreu (2006).

Figura 5 - Áreas controle (A) Laguna, (B) Jaguaruna, (C e D) Balneário Arroio do Silva.



Fonte: Do autor (2013)

## 2.2 COLETA DOS ANIMAIS

O estudo foi dividido em dois grupos: (1) controle e (2) expostos ao agroecossistema, com um número de 20 animais por grupo. Este número se faz necessário, devido aos animais silvestres apresentarem maior variabilidade genética, e necessita de um número mais elevado do que aquele utilizado com animais de linhagem pura, para se obter um melhor padrão de resposta.

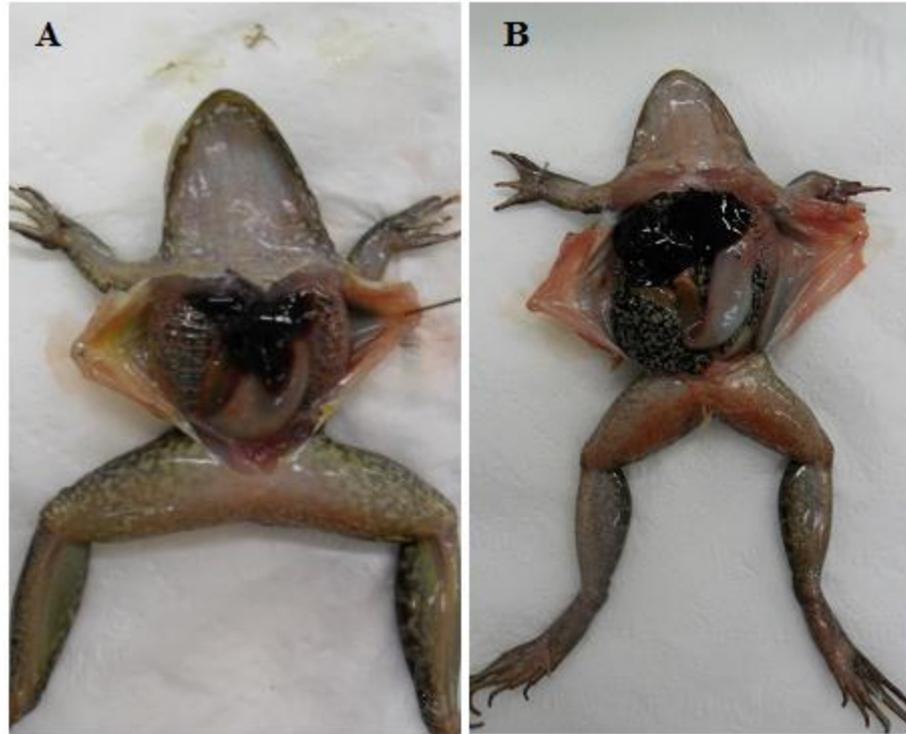
A coleta dos animais da espécie *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) (rã manteiga) foi realizada manualmente, no período noturno (do crepúsculo até as 23h00min), entre os meses de novembro/2012 e março/2013. Na lavoura de arroz os animais foram capturados em novembro/2012, logo após a inundação das lavouras e pelo menos 15 dias após a aplicação dos agrotóxicos. Nas áreas controle, os animais foram capturados nos meses de fevereiro e março de 2013, logo após períodos de chuva.

O sexo dos animais não foi identificado no momento da coleta, pois muitos animais não estavam vocalizando. Foi adotado como parâmetro de corte para a inclusão dos animais no estudo o peso igual ou superior a 30 g. O peso igual a 30 g foi considerado como o mínimo para que o animal fornecesse amostras das vísceras em volume adequado à necessidade dos testes bioquímicos.

Após a captura, os animais foram acondicionados individualmente em sacos plásticos devidamente identificados e com água nativa, ainda no campo os animais foram submetidos à eutanásia com lidocaína 5%, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente levados para o Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, onde foram congelados em freezer -80°C. No dia seguinte, os animais foram descongelados em temperatura ambiente, foram extraídos o fígado, pulmões, rins e músculos dos membros posteriores dos anfíbios (Figura 6) para as análises bioquímicas de estresse oxidativo.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense, registrado no protocolo 122/2012 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO número 37086-3.

Figura 6 - Procedimentos para as retiradas de amostras de *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815), (A) macho e (B) fêmea.



Fonte: Do autor (2013)

## 2.3 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 2.3.1 Medidas de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como indício de peroxidação lipídica no fígado, pulmão, rim e músculo foram medidos através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, onde as amostras foram homogeneizadas com tampão PBS (pH 7,4). O homogenato foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec<sup>®</sup>) a 12% e agitado vigorosamente durante cerca de 5s. Em seguida, incubado em tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7,4 (0,1 mM DTPA), Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 0,73% durante 60 min a 100°C. Após, o material foi resfriado durante 15 min a 5°C, centrifugado (5 min a 5000 giros) e a absorvância do cromóforo de cor rósea foi medida em 535nm, sendo os valores expressos em malondialdeído (MDA) por miligrama de proteína (nmol/mg/proteína) conforme método descrito proposto por Draper e Hadley (1990).

### 2.3.2 Medida de dano oxidativo e em proteínas

O dano protéico no fígado, pulmão, rim e músculo foram determinados pela medida de grupos carbonil. As amostras obtidas foram precipitadas pela adição de ácido clorídrico (HCl, Vetec<sup>®</sup>) e as proteínas dissolvidas com 2,4 - dinitrofenilidrazina (DNPH, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Os grupamentos carbonil formados pela reação base de Schiff foram medidos em espectrofotômetro pela absorvância em 370 nm. Os resultados foram expressos por carbonilação por miligrama de proteína (nmol/mg/proteína) (LEVINE et al., 1990).

### 2.3.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (JOHANSSON; BORG, 1988). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito (BANNISTER; CALABERESE, 1987). Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg/proteína).

### 2.3.4 Determinação de proteínas

O método de determinação de proteínas totais utilizado foi o proposto por Lowry et al. (1951) para a normalização dos resultados. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu, Fator 1<sup>®</sup>), que sofre uma redução quando reage com proteínas, produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm.

### 2.3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças entre os grupos foram determinadas por Teste T *student*, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS 20:0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Os resultados foram analisados no todo, incluindo todos os animais capturados, machos e fêmeas e separado os machos. Foi adotado este procedimento pelo fato de que os hormônios reprodutivos podem interferir nas respostas ao estresse oxidativo das fêmeas em mamíferos, conforme assinala Lazzaretti et al. (2008). Como não se sabe o comportamento dos anfíbios em relação a isto e pelo fato das coletas terem ocorrido durante a época reprodutiva da espécie, os resultados foram analisados separados.

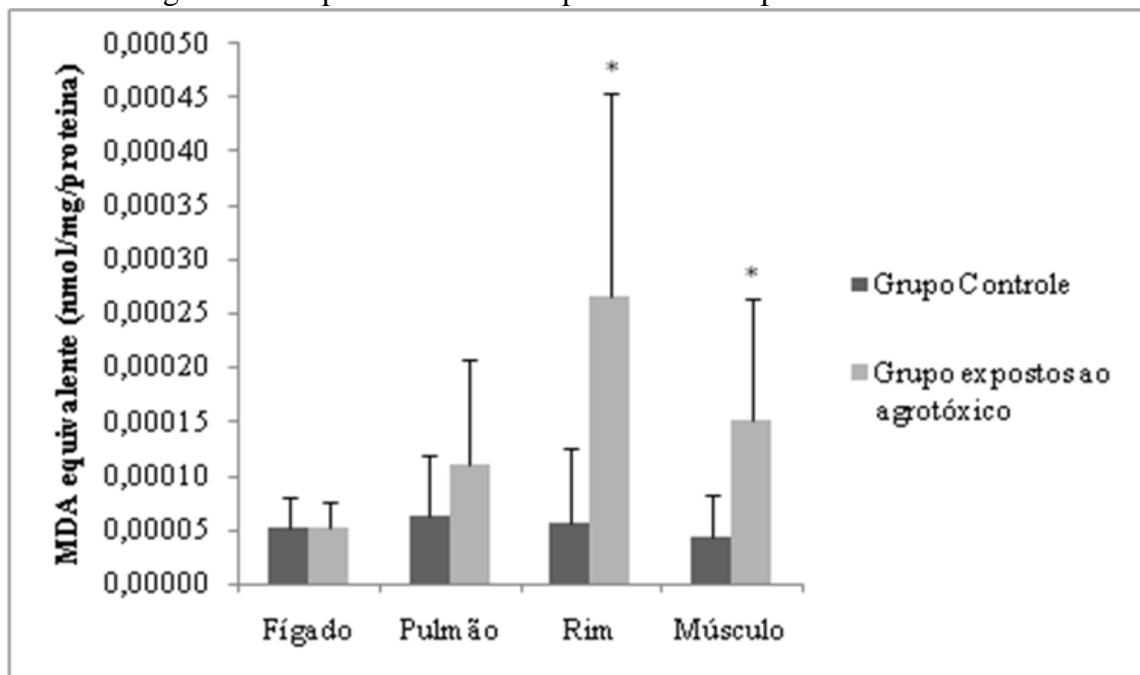
### 3 RESULTADOS

Foram capturados animais machos e fêmeas com peso entre 30 á 60 gramas. Dos quarenta animais capturados 24 eram machos e 16 eram fêmeas. Dentre as fêmeas 6 pertenciam ao grupo controle e 10 pertenciam ao grupo exposto.

#### 3.1 DANOS OXIDATIVOS

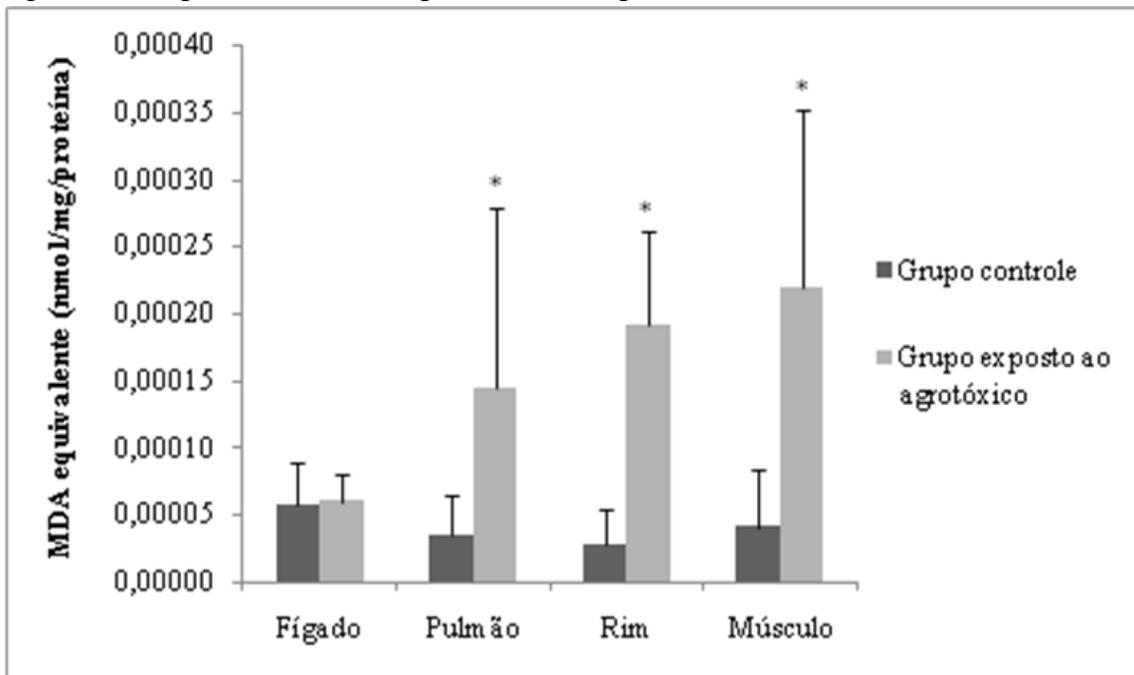
Foi observado um aumento significativo nos níveis de TBARS apenas no rim ( $p=0,001$ ) e no músculo ( $p=0,001$ ) dos animais expostos aos agrotóxicos em comparação ao grupo controle (Figura 7). Ao separar animais machos observou-se um aumento significativo nos níveis de TBARS no pulmão ( $p=0,03$ ), rim ( $p=0,01$ ) e músculo ( $p=0,01$ ) (Figura 8) de animais expostos ao agrotóxico.

Figura 7- Níveis de peroxidação lipídica em fígado, pulmão, rim e músculo de *L. latrans* (machos e fêmeas) Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=20). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

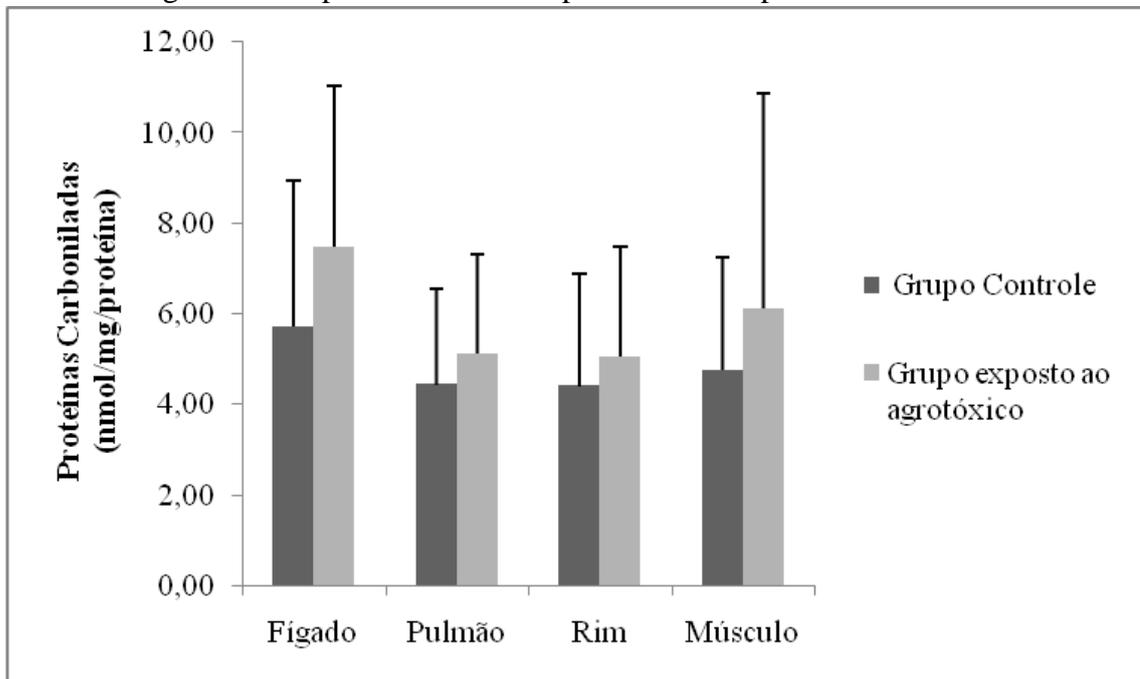
Figura 8 - Níveis de peroxidação lipídica em fígado, pulmão, rim e músculo de *L. latrans* (machos) Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=9). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

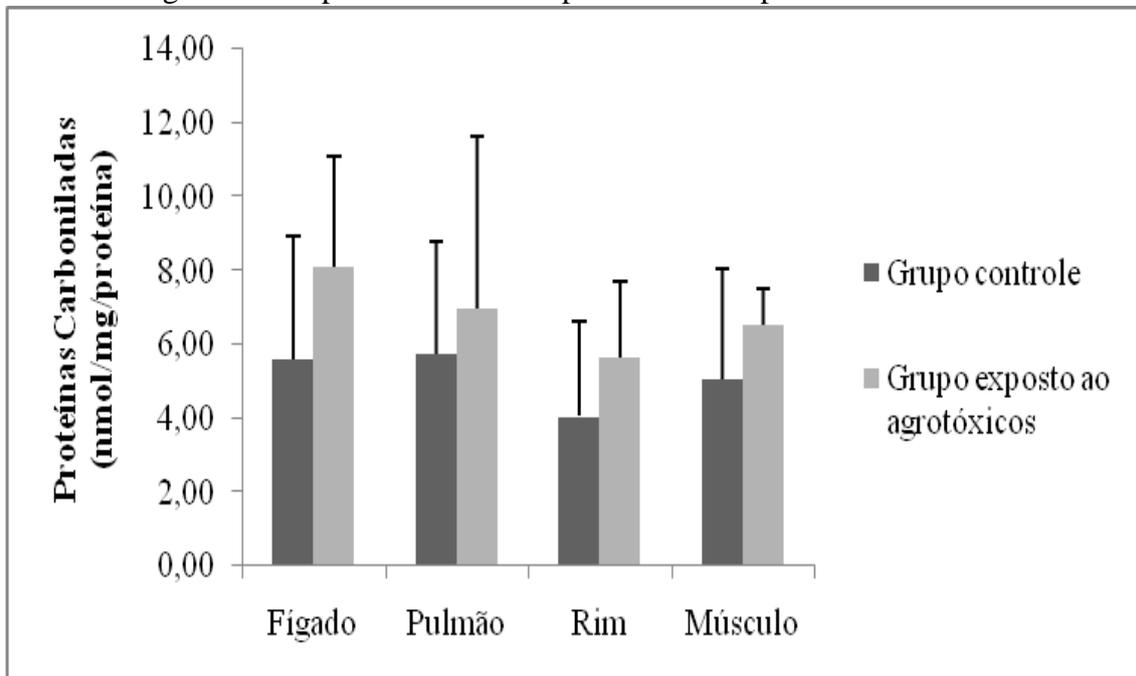
As diferenças observadas entre os grupos analisados (exposto e controle) em relação ao dano oxidativo em proteínas, indicado pelos níveis de formação dos grupos carbonil em *Leptodactylus latrans*, não foi estatisticamente significativo (Figura 9), nem quando foram excluídas as fêmeas nos testes estatísticos (Figura 10), embora tenham mostrado uma tendência ao aumento em animais expostos aos agrotóxicos.

Figura 9 - Níveis de proteínas carboniladas em fígado, pulmão, rim e músculo de *L. latrans* (machos e fêmeas) Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=20). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

Figura 10 - Níveis de proteínas carboniladas em fígado, pulmão, rim e músculo de animais machos de *L. latrans*. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=9). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



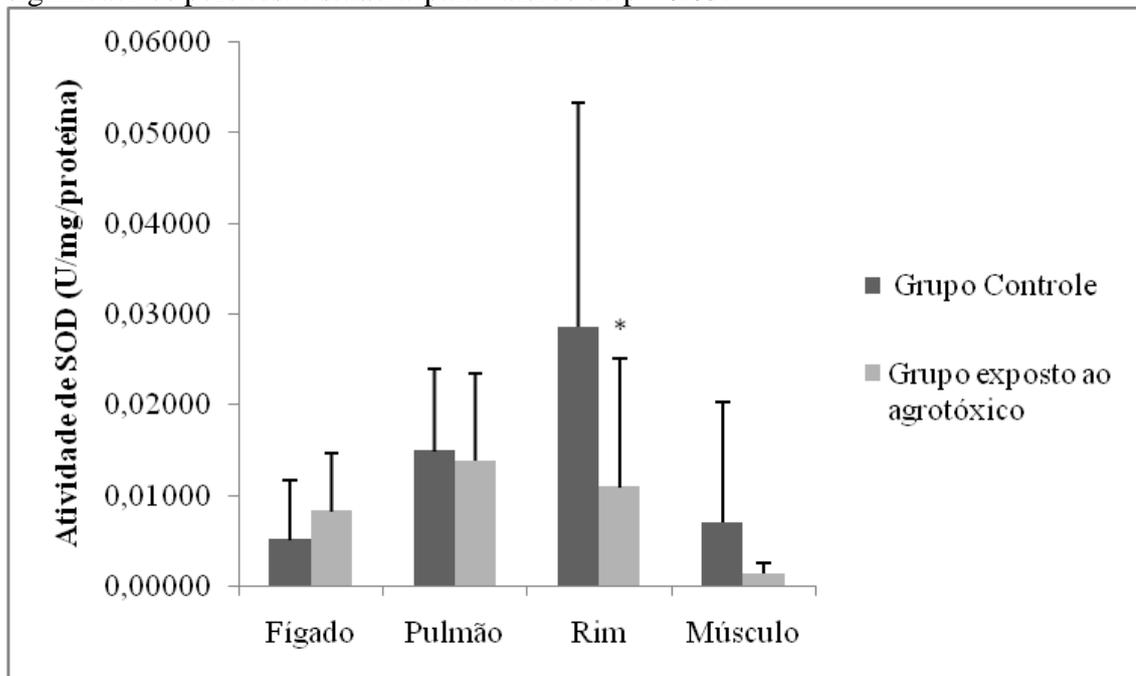
Fonte: Do autor (2013)

### 3.2 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O mecanismo bioquímico de defesa encontrado nos seres vivos, dependem da capacidade funcional de cada tecido, bem como a resposta das enzimas a diferentes substratos contaminantes (COGO et al., 2009).

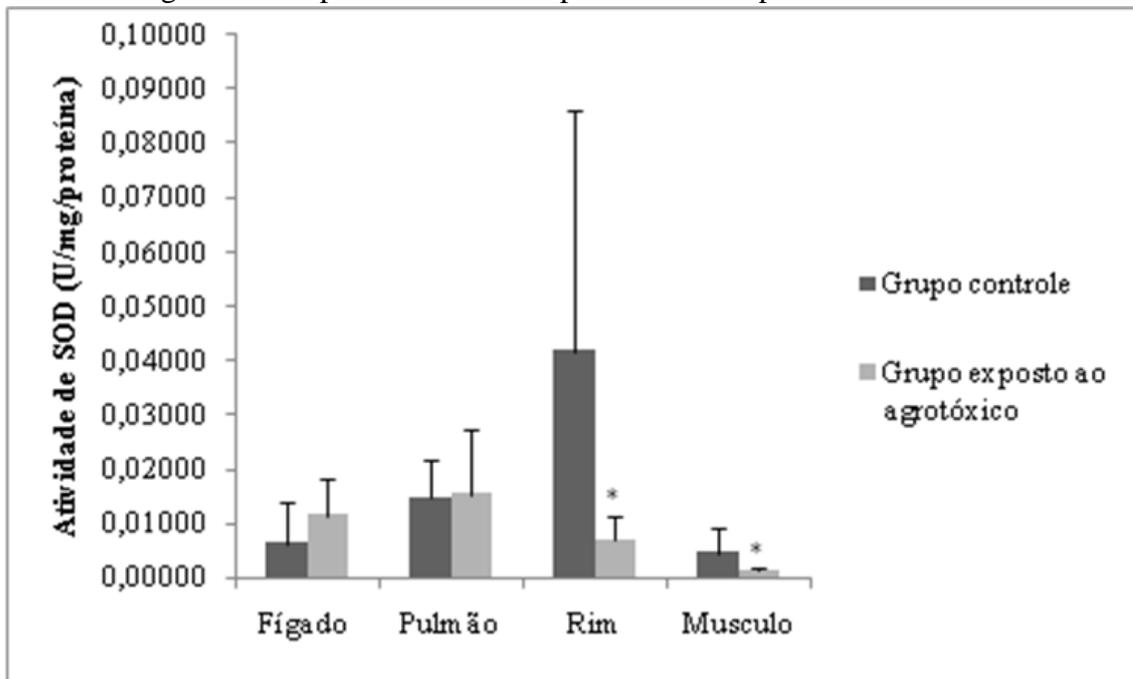
No presente estudo foi observada uma diminuição significativa nos níveis de SOD no rim ( $p=0,03$ ) de *Leptodactylus latrans* e uma tendência a diminuição em músculo expostas aos agrotóxicos em comparação ao grupo controle (Figura 11). Em animais machos os níveis de SOD diminuíram significativamente no rim ( $p=0,03$ ) e no músculo ( $p=0,03$ ) do grupo exposto ao agrotóxico (Figura 12).

Figura 11 - Atividade da enzima superóxido dismutase em fígado, pulmão, rim e músculo de *L. latrans*. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=20$ ). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

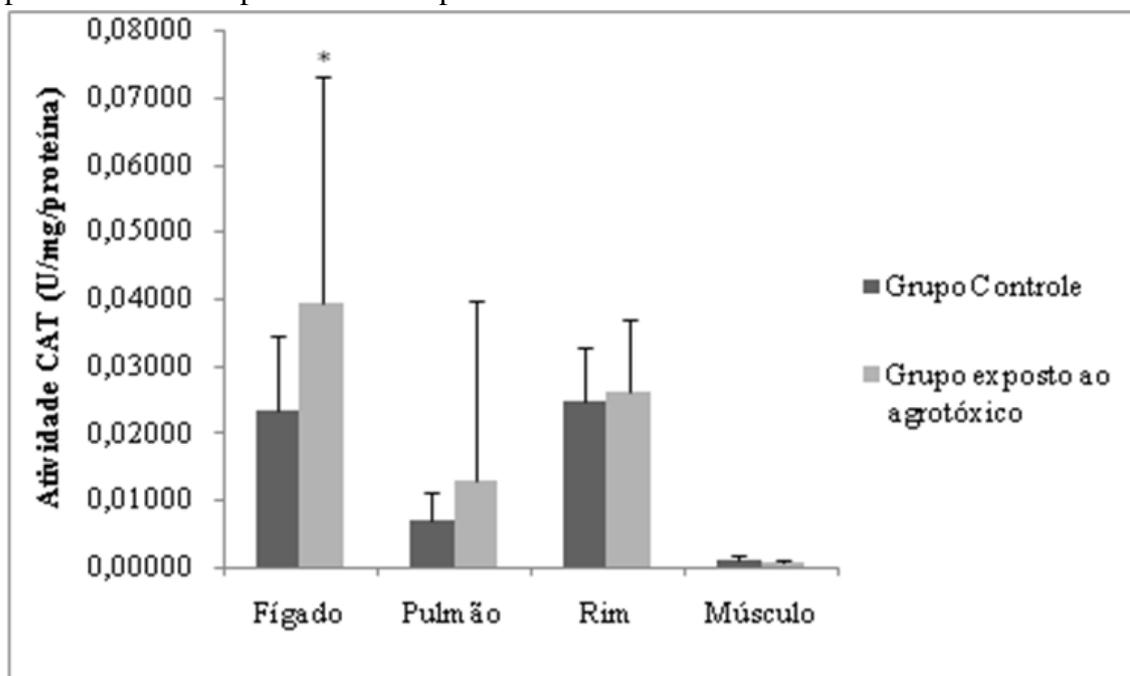
Figura 12 - Atividade da enzima SOD em fígado, pulmão, rim e músculo de animais machos de *L. latrans*. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=9). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

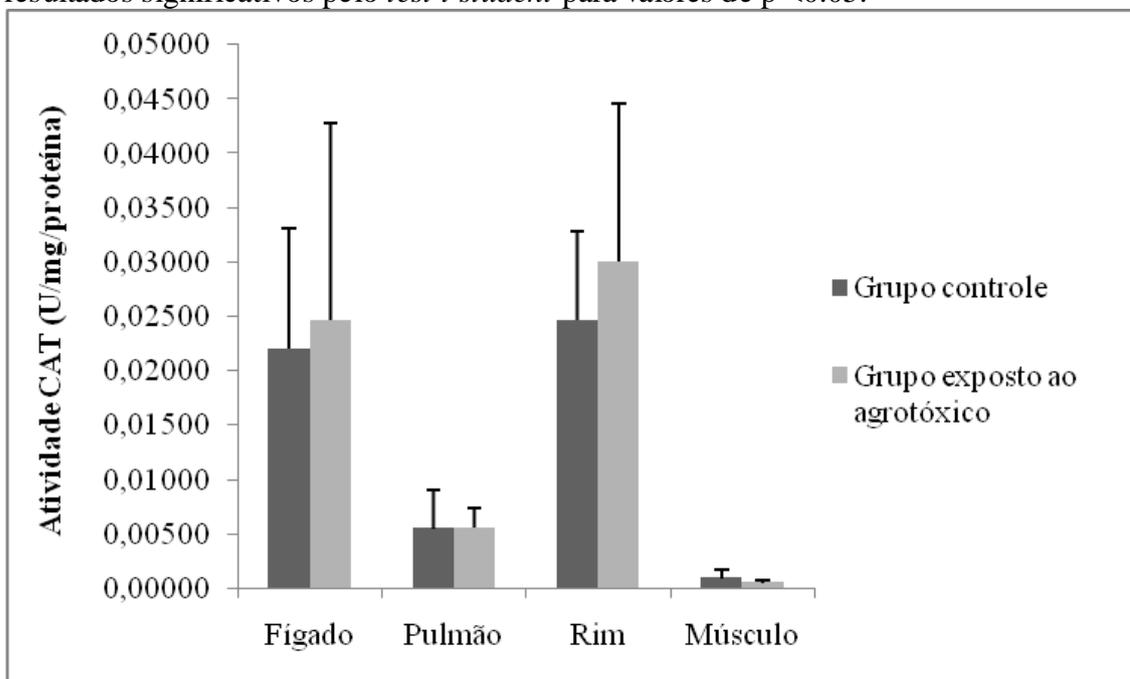
A atividade da catalase aumentou significativamente apenas no fígado ( $p=0,04$ ) de *Leptodactylus latrans*, expostas aos agrotóxicos quando comparadas ao grupo controle (Figura 13). Enquanto os animais machos expostos aos agrotóxicos não diferiram nos níveis desta enzima quando comparados ao grupo controle (Figura 14).

Figura 13 - Atividade da enzima catalase em fígado, pulmão, rim e músculo de *L. latrans*. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=20). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

Figura 14 - Atividade da enzima catalase em fígado, pulmão, rim e músculo de animais machos de *L. latrans*. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=9). \* mostra resultados significativos pelo *test t student* para valores de  $p < 0.05$ .



Fonte: Do autor (2013)

## 4 DISCUSSÃO

As lavouras de arroz são formadas por um mosaico de ambientes aquáticos e terrestres, que abrigam uma rica biodiversidade, mantida pela rápida colonização, reprodução e crescimento dos organismos (HOOK, 1994).

O uso de agrotóxicos é uma prática muito antiga na agricultura brasileira, o que têm contribuído para a degradação dos ecossistemas, sendo mais diretamente afetado o ambiente aquático (RÜEGG et al., 1991). Os principais agroquímicos utilizados na lavoura de arroz são compostos organofosforados e organoclorados. Esses compostos podem se acumular na cadeia alimentar devido a sua lipofilicidade e persistência e a sua toxicidade deve-se pelo fato de serem estruturalmente diferentes das substâncias encontradas na natureza e, portanto, alguns organismos contaminados não têm a capacidade de metabolizá-las, causando a acumulação (BAIRD, 2002).

O solo é onde se encontra a forma mais concentrada dos organoclorados, tendo um tempo de meia-vida maior, sendo transferidos para culturas futuras, podendo também permanecer ativos por um curto período de tempo. A água é mais afetada pela aplicação direta e carregamento da chuva. O ar pode ser alterado pela volatilização dos produtos químicos junto com a água e afetar populações a certa distância (RUEGG et al., 1991).

O ambiente imediato e circundante da lavoura de arroz em estudo pode estar sendo alterado constantemente por esses fatores, pois está localizada em uma área onde se cultiva arroz (*Oryza sativa* L.) há mais de dez anos e com uso frequente e pouco controlado de agrotóxicos. Além dos agroquímicos a água que irriga as lavouras é afetada por outros cultivos agrícolas, despejos industriais e domésticos que poderiam acentuar ainda mais os efeitos deletérios sobre os anfíbios residentes nas canchas de arroz irrigado.

Deve-se levar em conta ainda que os produtos químicos utilizados nas lavouras de arroz são geralmente aplicados em misturas, o que pode levar a um efeito sinérgico, que provoca ou potencializa as respostas dos organismos, de modo diferenciado daquelas obtidas, quando os organismos são expostos aos produtos de forma individualizada (HUGHES, 2002).

Alguns estudos mostram que diversos animais aquáticos estão sofrendo alterações morfológicas e metabólicas em ambientes com presença de agrotóxicos. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a exposição a um organoclorado provocou edema nas brânquias, separação do epitélio lamelar, fusão lamelar e inchaço das células epiteliais (CAPKIN et al., 2006).

Tardivo e Rezende (2005) realizaram estudos da determinação de organoclorados com diferentes gêneros de peixes e concluíram que o local mais impactado está mais próximo da zona de atividade agrícola e o grau de contaminação diminui à medida que aumenta a distância. Esses autores também afirmam que há uma tendência do organismo em acumular organoclorados onde há maior teor de lipídeos.

Moreira et al. (2012) observaram malformações no sapo cururu (*Rhinella schneideri*) de áreas agrícolas, sendo este resultado confirmado pelas análises de carga parasitária, presença de micronúcleos, DNA alterado e análise histológica de órgãos e tecidos. Peltzer et al. (2011) acompanhou por nove anos as anormalidades morfológicas em áreas de floresta e áreas agrícolas, e concluiu que as espécies *Rhinella fernandezae*, *Leptodactylus latrans*, *Hypsiboas pulchellus* apresentaram maiores anormalidades morfológicas em áreas de agricultura.

Esses resultados são evidências que as substâncias tóxicas encontradas nos agrotóxicos são capazes de interagir com os organismos vivos nos ambientes aquáticos causando inúmeras alterações, podendo gerar graves desequilíbrios ecológicos dependendo do grau de impacto e do tempo de exposição (LIVINGSTONE et al., 1994).

O estresse causado pelos agrotóxicos deve-se a produção de EROs, como o íon superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio livre (ATLI; CANLI, 2007). Esses radicais podem ser formados pelo contato do organismo com os agrotóxicos, que são bioacumulados e reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos graxos, gerando o estresse oxidativo e diversas injúrias bioquímicas ou genéticas (COGO et al., 2009). Assim os parâmetros bioquímicos são bons indicadores de estresse causado por poluentes (PANDEY et al., 2003).

Infelizmente existem poucos estudos sobre o estresse oxidativo em anfíbios que habitam áreas agrícolas com uso de agrotóxicos, embora haja uma grande quantidade e diversidade de anuros que habitam esses locais. Além disso, pouco se sabe sobre a interferência hormonal no estresse oxidativo em rãs fêmeas, porém se sabe que na época reprodutiva ocorre a indução de alguns hormônios, que podem interferir nos parâmetros bioquímicos (BROWNE; FIGIEL, 2006; LAZZARETTI et al., 2008).

No presente estudo os danos oxidativos foram medidos pelo aumento dos níveis de TBARS assim como o número de proteínas carboniladas. O aumento nos níveis de TBARS no rim e no músculo de animais expostos aos agrotóxicos assemelham-se com os obtidos por Dorval et al. (2005), onde peixes da espécie *Catostomus commersoni* apresentaram danos em lipídeos em áreas utilizadas pela agricultura, os resultados desses autores ainda mostram que o

tecido do rim foi mais prejudicado do que o tecido do fígado, concordando também com o presente trabalho.

Winston et al. (1998) sugerem que o fígado pode ser menos vulnerável ao estresse oxidativo que o tecido renal. Ezemonye e Enuneku (2011), também observaram um aumento no nível de TBARS em fígados de sapos expostos a metais pesados, cerca de 79,5% em comparação com o grupo controle. Ao separar animais machos observou-se também dano em lipídeos no tecido do pulmão, que não foi observado no grupo todo de animais (machos e fêmeas em conjunto), isso pode ter ocorrido devido a indução hormonal que as fêmeas apresentam no seu período reprodutivo, interferindo assim na diminuição dos parâmetros inflamatórios, assim como na diminuição no produto de lipoperoxidação MDA (LAZZARETTI et al., 2008). Isso pode ser uma evidência de que animais machos da espécie *Leptodactylus latrans* são melhores bioindicadores para o estresse oxidativo.

Em relação ao dano oxidativo em proteínas, indicado pelos níveis da formação dos grupos carbonil, obteve-se um aumento de ordem não significativa encontrada no grupo exposto aos agrotóxicos, supostamente o organismo dos anfíbios pode estar sofrendo adaptações para sobreviver às alterações provocadas pelos agroquímicos, e por isso não estão apresentando danos nas proteínas, pois a espécie *Leptodactylus latrans* tem se mostrado muito resistente e comum em lugares poluídos (IZECKSOHN; CARVALHO, 2001).

Através de testes enzimáticos é possível definir alguma alteração causada no organismo como consequência da atividade antrópica e funciona como um sinal de alerta de contaminação. A SOD é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio (CHANDRAN et al., 2005; GU et al., 2006). No presente estudo a diminuição da atividade de SOD no rim no grupo geral (machos e fêmeas), e no rim e músculo de animais machos de *Leptodactylus latrans* expostas aos agrotóxicos mostram que esta espécie está sofrendo estresse oxidativo nesta área. Nos rins e nos músculos ocorreram níveis altos de peroxidação lipídica e baixos níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase. Esses resultados concordam com Gu et al. (2006), que analisaram moluscos bivalves (*Pinctada fucata*) expostos a altas concentrações de metais apresentando inibição enzimática. Ezemonye e Enuneku (2011) registraram um aumento na atividade de SOD no fígado de rãs (*Bufo maculatus*) expostas a metais, e apontaram que o aumento foi dependente da concentração, uma vez que as respostas das enzimas podem variar de acordo com as concentrações dos poluentes (ATLI ; CANLI, 2007). É de extrema importância ressaltar que estamos comparando os resultados com organismos de espécies diferentes, pela falta de estudos realizados com anfíbios e em especial a espécie *Leptodactylus latrans*. Desta forma

organismos de espécies diferentes podem responder a formas variadas aos processos fisiológicos.

A atividade da catalase também é muito importante por ser uma enzima antioxidante que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse oxidativo (LAN et al., 1995). O aumento da atividade de catalase foi observado no fígado de *Leptodactylus latrans* expostas aos agrotóxicos no presente estudo. Esse aumento pode explicar o motivo deste órgão não estar sofrendo dano em lipídios (TBARS). Talvez o fato deste órgão ser tão vulnerável a poluentes (por exemplo agrotóxicos), as células podem aumentar a produção de enzimas antioxidantes, como a catalase, a fim de contornar o estresse oxidativo conforme assinala Gupta et al. (1991).

Bainy et al. (1996) obtiveram resultados diferentes na espécie *Oreochromis niloticus* no monitoramento de áreas poluídas, registrando inibição da catalase. Outros autores também obtiveram uma diminuição da catalase em áreas contaminadas por agrotóxicos, como o trabalho de Dautremepuits et al. (2004), que avaliou fígado e rim em peixes da espécie *Cyprinus carpio* L. O resultado foi o aumento da atividade da catalase nos quatro primeiros dias de exposição, e uma diminuição desses níveis a partir do oitavo dia. Isso pode ocorrer devido às defesas antioxidantes serem esgotadas frente a substâncias pró-oxidantes, dependendo do tempo e intensidade da exposição (TREVISAN, 2008).

Estudos realizados por Dorval et al., (2005) revelaram aumento da atividade da catalase em *Catostomus commersoni* de áreas contaminadas por atividade agrícola, e esse aumento de catalase foi superior no fígado em comparação ao rim, mostrando que tecidos diferem na capacidade de defesa contra o poluente. Em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) expostos a diferentes concentrações de produtos químicos ocorreu aumento na atividade da catalase, (BOCCHETTI et al., 2008).

Estudos realizados por Ezeonye e Enuneku (2011) registraram aumento significativo da atividade de catalase em fígado de rãs (*Bufo maculatus*) expostas a metais, e que este aumento foi dependente da concentração. Moraes et al. (2007) utilizou *Leporinus obtusidens* de lavouras de arroz, e observou um aumento de dano oxidativo em lipídios e da enzima catalase no fígado de animais expostos a agrotóxicos. O aumento na atividade de enzimas antioxidantes é normalmente observada em animais de ambiente poluídos, como o sistema de SOD-CAT representam a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (ATLI; CANLI, 2007). Porém nos organismos alguns antioxidantes podem ser esgotados frente ao dano oxidativo de áreas altamente poluídas (REGOLI; PRINCIPATO, 1995).

Aparentemente pesticidas clorados são facilmente encontrados nos organismos de animais selvagens, devido à exposição constante das espécies em campos agrícolas (LAJMANOVICH et al., 2005).

Particularmente os anfíbios possuem uma história de vida morfofisiológica e características reprodutivas que podem torna-los sensíveis a exposições de poluentes. Por exemplo o seu ciclo bifásico em que larvas de anuros são depositadas em ambientes poluídos, os ovos são permeáveis a água e a pele dos anfíbios oferecem pouca resistência ao fluxo de produtos químicos (HOPKINS et al., 1998).

Em síntese, os resultados do presente estudo oferece dados sobre o estresse oxidativo ocorridos na espécie *Leptodactylus latrans* em áreas de lavouras de arroz contaminadas pelo uso de agrotóxico, bem como a diferença dos efeitos oxidativos em animais machos.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra o estresse oxidativo ocorrido na espécie *Leptodactylus latrans* expostas aos agrotóxicos de lavoura de arroz. Aparentemente os tecidos mais sensíveis ao estresse oxidativo foram o rim e o músculo, pois apresentaram elevados níveis de dano em lipídios acompanhados pela diminuição da enzima antioxidante superóxido dismutase. Esses resultados também foram acompanhados em apenas animais machos. Alguns estudos realizados em mamíferos mostram que fêmeas apresentam indução hormonal e por esse fato podem apresentar diferentes níveis de estresse oxidativo, porém estudos em anfíbios ainda são desconhecidos.

O tecido do fígado aparentemente se mostrou adaptado ao estresse oxidativo, uma vez que não apresentou danos e aumentou a sua defesa antioxidante pela enzima catalase, mostrando que tecidos diferem no que diz respeito à capacidade de defesa contra o estresse oxidativo induzido por poluentes.

O resultado deste estudo permitiu avaliar a possível interação das espécies reativas de oxigênio em diferentes tecidos na espécie *Leptodactylus latrans* expostas aos agrotóxicos em lavoura de arroz, bem como a atuação do sistema de defesa antioxidante enzimático.

A espécie de anfíbio *Leptodactylus latrans* demonstrou ser uma espécie adequada para o estudo do efeito da poluição em ambientes aquáticos, uma vez que esta espécie é muito encontrada em ambientes poluídos, no entanto, estudos futuros utilizando esta espécie são necessários para demonstrar outros efeitos adaptativos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, R. L. **Mapa do Estado de Santa Catarina**. 2006. Disponível em: <Image:SantaCatarina MesoMicroMunicip.svg>. Acesso em: 12 dez. 2012.
- ACHAVAL, F; OLMOS, A. **Anfibios y Reptiles del Uruguay**. 4. ed. Montevideo: Serie Fauna, 2009. 160 p.
- AMES, B. N; SHIGENAGA, M. K; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- ATLI, G; CANLI, C. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry Physiology Part C**, v. 145, p. 282-287, 2007.
- BAINY, A. C. D; SAITO, E; CARVALHO, P. S. M; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 151-162, 1996.
- BAIRD C. **Química Ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- BARBOSA, L. F. **Danos em DNA promovidos pela enzima Cu, Zn-Superóxido Dismutase: implicações para a apoptose em um modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica**. 2008. 140 f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BANNISTER, J. V; CALABERESE, L. Assays for SOD. **Methods Biochem Anal**, p. 279-312, 1987.
- BASF, **Manual do Basagran 480**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/BASAGRAN480.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- BASTOS, R. P; MOTTA, J. O; LIMA, L. P; GUIMARÃES, L. D. **Anfibios da floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. [S.l.]: Semarh, 2003. 82p.
- BAYER, Bayer Crop Science; **Manual do Decis 25 EC**. Disponível em: <<http://www.bayercropscience.com.br/produtos/downloads/Decis25CE-REFL.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- BEISWENGER, R.E. Integrating anuran amphibian species into environmental assessment programs, p.159-165. In: SZARO R. C.; SEVERSON, K. E.; PATTON, D. R. (Ed.). **Management of Amphibians, Reptiles, and Small Mammals in North America: Proceedings of the Symposium**. Arizona, USDA Forest Service, General Technical Report RM-166, 458 p. 1988.

BEZERRA, C. S. **Estrutura genética e sensibilidade a fungicidas de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo cinzento da mamomeira.** 2007. 47 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

BOCCHETTI, R; FATTORINI, D; PISANELLI, B; MACCHIA, S; OLIVIERO, L; PILATO, F; PELLEGRINI, D; REGOLI, F. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 257-266, 2008.

BROWNE, R. K; FIGIEL, C. R. Amphibian hormonal induction. **Royal Zoological Society of Antwerp**. 2006.

CAPKIN, E; ALTINOK, I; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, v. 64, p. 1793-1800, 2006.

CHANDRAN, R; SIVAKUMAR, A. A; MOHANDAS, S; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v. 140, p. 422-426, 2005.

COGO, A. J. D; SIQUEIRA, A. F; RAMOS, A. C; CRUZ, Z. M. A; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**. n.7, p. 37- 42, 2009.

CONCENÇO, G; LOPES, N.F; ANDRES, A; MORAES, D.M; SANTOS, M.Q; RIEFFEL FILHO, J.A; VILELLA, J.V. Controle de plantas daninhas em arroz irrigado em função de doses de herbicidas pré-emergentes e início da irrigação. **Planta daninha**, v. 24, n. 2, p. 303-309, 2006.

COPATTI, C. E; GARCIA, L. O; BALDISSEROTTO, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotropica**, v. 9 , n. 4, p. 235-242, 2009.

DAL-PIZZOL, F; KLAMT, F; VIANNA, M; SCHRODER, N; QUEVEDO, J; BENFATO, M. S; MOREIRA, J. C. F; WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, n. 3, p. 179-182, 2000.

DAL-PIZZOL, F; RITTER, C; KLAMT, F; ANDRADES, M; FROTA, J. R; DIEL, C; ROCHA, A; LIMA, C; BRAGA, A; SCHWARTSMANN, G; MOREIRA, J. Modulation of oxidative stress in response to gamma-radiation in human glioma cell lines. **Journal of Neuro-oncology**, v. 61, n. 2, p. 89-94, 2003.

DAUTREMEPUITS, C; PARIS-PALACIOS, S; BETOULLE, S; VERNET G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 137, p. 325-333, 2004.

DEIQUES, C. H; STAHNKE, L. F; REINKE, M., SCHMITT, P. **Anfíbios e Répteis de Aparatos da Serra Rio Grande do Sul – Santa Catarina, Brasil**. 10. ed. Pelotas: USEB, 2007. 117 p.

DORVAL, J; LEBLOND, V; DEBLOIS, C; HONTELA, A. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1273–1280, 2005.

DRAPER, H. H; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DOWAGRO – Dow Agro Science. **Manual do Produto Ricer**. Disponível em: <[http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh\\_0525/0901b80380525d01.pdf?filep=br/pdfs/noreg/013-05078.pdf&fromPage=GetDoc](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_0525/0901b80380525d01.pdf?filep=br/pdfs/noreg/013-05078.pdf&fromPage=GetDoc)> Acesso em: 30 mar. 2013.

DUELLMAN, W. E; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. 2<sup>a</sup> Ed. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 1994. 670 p.

EPAGRI. **Dados e Informações Biofísicas da Unidade de Planejamento Regional Litoral Sul Catarinense – UPR 8**. EPAGRI, 2001, 38p.

EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. v.1, Florianópolis: Epagri/Cepa, 2005.

EZEMONYE, L. I; ENUNEKU, A. A. Biochemical changes in the toad *Bufo maculatus* treated with sub lethal concentrations of cadmium. **World Journal Biology Research**, v. 4, p. 15-20, 2011.

FRAGA, W.G. **Identificação e determinação dos principais ingredientes ativos em agrotóxicos ilegais apreendidos pela polícia federal do Brasil**. 2012.63 f. Dissertação (Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

GUPTA, S; ATHAR, M; BEHARI, J. R; SRIVASTAVA, R. C. Cadmium-mediated induction of cellular defense mechanism: a novel example for the development of adaptive response against a toxicant. **Industrial Health**, v. 29, p. 1-9, 1991.

GU, J; YU, L; LIPING, X; RONGQING, Z. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 144, p. 184–190, 2006.

HADDAD, C. F.F; TOLEDO, L. F; PRADO, C. P. A. **Anfíbios da mata atlântica: guia ilustrado de anuros da mata atlântica**. 1. ed. São Paulo: Neotropical, 2008. 244 p.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press Inc, 1999. 704 p.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**.

4. ed. New York: Oxford University Press, 2007. 634 p.

HOOK, T.V. The conservation challenge in agriculture and the role of entomologists. **Florida Entomologist**, v. 77, p. 42-73, 1994.

HOPKINS, W. A; CONGDON, J. D; ROWE, C. L; MENDONÇA, M. T. Elevated trace element concentrations in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 35, p. 325- 329, 1998.

HUGHES, I. **Risk Assessment of Mixtures of Pesticides and Similar Substances**. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Food Standards Agency, UK, 2002.

IBEGE. Cidades: Treze de Maio, Disponível em:  
<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 23 maio 2013.

IZECKSOHN, E; CARVALHO, S. P. **Anfíbios do município do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. 77 p.

JOHANSSON, L.H; BORG, L. A. H. A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. **Analytical biochemistry**, v. 174, p. 331-336, 1988.

KOPPEN, W. P. **Climatologia: con studio de los climas de la tierra**. Mexico: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478 p.

LAJMANOVICH, R; DE LA SIERRA, P; MARINO, F; PELTZER, P; LENARDÓN, A; LORENZATTI, E. Determinación de residuos de organoclorados en vertebrados silvestres del litoral fluvial de Argentina. **Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino II**, p. 255-262, 2005.

LAN, W. G; WONG, M. K; CHEN, N; SIN, Y. M. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. **Aquaculture**, v. 131, p. 219-230, 1995.

LAZZARETTI, C; ANTUNES, M. V; SILVA, C. C; BORSOI, M; ARDENGHI, P. G; SUYENAGA, E. S; GAMARO, G. D. Comparação da resposta inflamatória aguda entre animais machos e fêmeas da linhagem wistar. **Estudos**, v. 35, n. 11/12, p. 1151-1167, 2008.

LEVINE, R. L; GARLAND, D; OLIVER, C. N; AMICI, A; LENZ, A. G; SHALTIEL, S; STADMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LIMA, A. P; MAGRUSSON, W. E; MENIN, M; ERDTMANN, L. K; RODRIGUES, D. J; KELLER, C; HÖDL, W. **Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke, Amazônia central**. Manaus: Áttema Design Editorial, 2005. 168 p.

LIMA, E. S; ABDALLA, D. S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIVINGSTONE, D. R; FÖRLIN, L; GEORGE, G. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. **Freshwater Biological Association**, p. 156-171, 1994.

LOEBMANN, D. **Os anfíbios da região costeira do extremo sul do Brasil**: Guia ilustrado. Pelotas: USEB, 2005. 76 p.

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUCCA, G. S. **Efeito dos resíduos da extração de carvão na diversidade de anfíbios anuros no município de Treviso, Santa Catarina**. 2009. 34 f. TCC (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2009.

MACHADO, R. A; BERNARDE, P. S. **Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy**. Londrina: Itedes, 2006. 169 p.

MEIRELLES, C. E. et al. **Agrotóxicos riscos e prevenção**. São Paulo: Fundacentro, 1991. 130 p.

MENDONÇA, R. A; CARVALHO, F; ZOCHE, J. J. Riqueza e distribuição de anfíbios anuros em uma área de mineração de carvão no sul de Santa Catarina, Brasil. In: XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, 2008, Curitiba. **Resumos em CdRoon do XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia**. Curitiba, 2008. v. 1. p. 1-1.

MICHIELS, C; RAES, M; TOUSSAINT, O; REMACLE, J. Importance of Se- glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235-248, 1994.

MORAES, B. S; LORO, V. L; GLUSCZAK, L; PRETTO, A; MENEZES, C; MARCHESAN, E; MACHADO, S. L. O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1597-1601, 2007.

MOREIRA, J. C; PERES, F; SIMÕES, A. C; PIGNATI, W. A; DORES, E. C; VIEIRA, S. N; STRÜSSMANN, C; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 1557-1568, 2012.

OXÍQUÍMICA, Oxiquímica Agro ciência; **Manual do produto Vegeto'il**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/VEGETOIL.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2013.

PANDEY, S; PARVEZ, S; SAYEED, I; HAQUE, R; BIN-HAFEEZ, B; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Science of the Total Environment**, v. 309, p. 105-115, 2003.

PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**, v. 2, n. 2, p. 71-79, 1996.

PELTZER, P. M; LAJMANOVICH, R. C; SANCHEZ, L. C; ATTADEMO, A. M; JUNGES, C. M; BIONDA, C. L; MARTINO, A. L; BASSO, A. Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 6, p. 432-442, 2011.

POSSAMAI, F. P; FORTUNATO, J. J; FEIER, G; AGOSTINHO, F. R; QUEVEDO, J; WILHELM FILHO, D; DAL-PIZZOL, F. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p.198–204, 2007.

REGOLI, F; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarker. **Aquatic Toxicology**, v. 31, p.143-164, 1995.

RESGALLA, C. J; NOLDIN, J. A; SANTOS, A. L; SATO, G; EBERHARDT, D. S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*cyprinus carpio*). *Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 12, p. 59-68, 2002.

RITTER, C. **Estresse oxidativo e o desenvolvimento da sepse**. 2003. 87f. Dissertação (Ciências biológicas, Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

RONSEIN, G. E; MIYAMOTO, S; BECHARA, E; DI MASCIO, P; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p.563-568, 2006.

RUEGG, E. F. et al. **Impactos dos agrotóxicos sobre o meio ambiente, saúde e a sociedade**. 2. ed. São Paulo: Ícone Editora, 1991. 91 p.

SYNGENTA, Syngenta Proteção de Cultivos. **Manual do Produto Priori**. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/de\\_fis/DFI/Bulas/Fungicidas/PRIORI.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/de_fis/DFI/Bulas/Fungicidas/PRIORI.pdf)> Acesso em: 06 abr. 2013a.

SYNGENTA, Syngenta Proteção de Cultivos. **Manual do Produto Score**. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/de\\_fis/DFI/Bulas/Fungicidas/SCORE.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/de_fis/DFI/Bulas/Fungicidas/SCORE.pdf)> Acesso em: 06 abr. 2013b.

TARDIVO, M; REZENDE, M. O. de O. Determinação de compostos organoclorados em peixes da Bacia do Betari, Vale do Ribeira (SP). **Revista Analytica**, n. 16, p. 50-60, 2005.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 63 f. TCC (TCC do Curso de Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

VALKO, M; RHODES, C. J; MONCOL, J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L; GOULART. M. O. F; MOURA. J. B. F; BENFATO, M. S; MANFREDINI, V; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VAZ, P. A. **O direito ambiental e os agrotóxicos**: responsabilidade civil, penal e administrativa. Porto Alegre: Livraria do Advogado, 2006. 240 p.

VERONESI, F. M; CALICETI, P; SCHIAVON, O; SERGI, M. Polyethylene glycol–superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p.587-606, 2002.

WINSTON, G. W; REGOLI, F; DUGAS, A. J; FONG, J. H. A rapid gas-chromatographic assay for determining oxyradicalscavenging capacity of antioxidants and biological fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 24, p. 480–493, 1998.

ZOCHE, J. J; SILVA, L. A; DAMIANI, A. P; MENDONÇA, R. A; PERES, B. P; SANTOS, C. E. I; DEBASTIANI, R; DIAS, J. J; ANDRADE, V. M; PINHO, R. A. (in press). Heavy metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal mining pollutants in the decline of the amphibian population. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**.

ZOCHE, J. J; ALEXANDRE, N. Z; COSTA, S; MENDONÇA, R. A; ZOCHE DE SOUZA, P ; CARVALHO, F. A metodologia de mapeamento de biótopos e sua aplicabilidade na recuperação de áreas degradadas pela mineração do carvão. In: MENDONÇA, A. W; SIQUEIRA, A. B; MARCOMIN, F. E. (Org.). **Educação, sociedade e meio ambiente em Santa Catarina: múltiplas abordagens**. 1. ed. São Leopoldo, RS: Oikos, 2012, v. 1, p. 315-345.

ZOCHE, J. J; DAMIANI, A. P; HAINZENREDER, G; MENDONÇA, R. A; PERES, P. B; SANTOS, C. E. I; DEBASTIANI, R; DIAS, J. F; ANDRADE, V. M. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-castingmine. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, p. 194–201, 2013.