

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS EFEITOS DO INSETICIDA
CARBARIL EM GIRINOS DE RÃ TOURO (LITHOBATES
CATESBEIANUS)**

**INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE EFFECTS OF THE INSECTICIDE CARBARYL
IN BULLFROGS LARVAS (LITHOBATES CATESBEIANUS)**

Gustavo Abel

Suelen Cristina Grott

Daiane Bitschinski

Nicole Grasmuk Israel

Sabrina Polido da Silva

Francisco Estevão Carneiro

Eduardo Alves de Almeida

Recebido em 21 de junho, 2020 aceito em 07 de outubro, 2020

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol13ed3.477>



RESUMO

Inseticidas carbamatos, como o carbaril, exercem efeitos tóxicos em animais por inibirem a atividade de esterases, tais como a acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE). Carbamatos usados na agricultura podem atingir os ambientes aquáticos afetando organismos não-alvo, tais como girinos de anuros. Variações na temperatura da água exercem efeitos importantes nas respostas dos organismos às intoxicações. No presente trabalho, foram caracterizadas as atividades da AChE e da CbE em fígado de girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*), obtendo-se condições ótimas de ensaio. Foram também caracterizadas *in vitro* as sensibilidades das duas enzimas à inibição pelo carbaril, sendo constatado que a AChE é mais sensível que a CbE. Posteriormente, animais foram expostos a duas concentrações (10 e 100 µg/L) do carbaril, por 10 dias, e sob três diferentes temperaturas (20, 25 e 30° C). Em nenhum dos grupos foi observada inibição significativa das esterases; porém houve aumento da atividade da CbE nos grupos expostos à maior concentração do carbaril nas duas menores temperaturas. A AChE teve menor atividade na maior temperatura. Apesar dos efeitos *in vitro*, os experimentos *in vivo* demonstraram que os girinos de rã touro apresentam mecanismos eficazes para evitar ou compensar eventuais inibições de suas esterases pelo carbaril.

Palavras-chave: Carbamato. Acetilcolinesterase. Carboxilesterase. Girino. carbaril.

ABSTRACT

Carbamate insecticides, such as carbaryl, exert toxic effects on animals by inhibiting the activity of B-esterases, such as acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE). Carbamates used in agriculture can reach aquatic environments affecting non-target organisms such as aquatic animals. Anuran amphibians are particularly sensitive to the effects of pesticides, because they present an initial stage of aquatic life and are often limited to environments close to agriculture. Variations in water temperature exert significant effects on organism responses to intoxications, as they alter the concentration of dissolved oxygen in water, metabolic reactions and ventilation of the gills. In the present study, the activities of AChE and CbE were characterized in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*), obtaining optimum conditions for testing the activities of the enzymes by spectrophotometry and in electrophoresis gels. The sensitivity of both enzymes to inhibition by the carbamate carbaryl in *in vitro* tests was also characterized, with AChE being more sensitive than CbE. Subsequently, animals were exposed to two concentrations (10 and 100 µg / L) of the carbaryl for 10 days, and under three different temperatures (20, 25 and 30 ° C). No significant inhibition of AChE or CbE was observed in any of the groups; but CbE increased activity in the groups exposed to the highest concentration of carbaryl at the two lower temperatures. Despite *in vitro* effects, *in vivo* experiments have demonstrated that bullfrog tadpoles present effective mechanisms to prevent or compensate for possible inhibition of their esterases by carbaryl.

Keywords: Carbamate. Acetylcholinesterase. Carboxylesterase. Tadpole. carbaryl.



1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios anuros estão representados por 7036 espécies (FROST, 2018), sendo que o Brasil possui a maior riqueza de anuros do mundo, com 1039 espécies registradas (SEGALLA et al., 2016). É um grupo intimamente ligado ao habitat em que vive se mostrando altamente dependente dele (DUELLMAN & TRUEB, 1994): necessitam de ambientes com água para o seu desenvolvimento, e umidade para evitar a dessecação da pele (DUELLMAN & TRUEB 1994; HADDAD & PRADO, 2005; HADDAD et al., 2013). Dessa forma, apresentam comportamentos exclusivos, (DUELLMAN & TRUEB, 1986), como ovos sem casca e ciclo de vida bifásico (HADDAD et al., 2013), tornando-os frágeis a mudanças ambientais, sejam elas modificações estruturais do habitat ou climáticas (WERNER et al., 2007), servindo como bons bioindicadores de qualidade ambiental (DUELLMAN & TRUEB, 1994; TOLEDO et al., 2010).

Desde a década de 1980 houve inúmeros estudos relatando um declínio em populações de anfíbios (SILVANO & SEGALLA, 2005). Esse declínio é visto por diversos fatores, sejam eles bióticos ou abióticos, como patógenos, infecção por parasitas, espécies invasoras, alterações climáticas, como o aquecimento global, chuvas ácidas, radiação ultravioleta e a fragmentação ou destruição de habitats (BLAUSTEIN et al., 2011; BOSCH, 2003; HADDAD et al., 2013; HAYES et al., 2010; SILVANO & SEGALLA, 2005). De acordo com estudos de Haddad et al., (2008), o aquecimento global é mais um novo fator que pode ocasionar problemas para a conservação da anurofauna brasileira, carecendo de dados sobre seus efeitos perante as espécies e ambientes mais ameaçados.

As atividades agrícolas apresentam grande influência nas comunidades de anfíbios, uma vez que tais atividades resultam tanto na modificação e fragmentação de habitats, como na lixiviação de agrotóxicos (CUNHA et al., 2008; BLAUSTEIN et al., 2011). A poluição ambiental derivada do uso exacerbado de agrotóxicos na

agricultura tem sido apontada como um dos principais fatores associados ao declínio de muitas espécies de anfíbios (TODD et al., 2011; FRYDAY & THOMPSON, 2012; HAYES et al. 2010). Esses compostos agem provocando efeitos diretos na mortalidade dos indivíduos ou indiretos, como o aparecimento de malformações em girinos, alterações e anormalidades gonadais em adultos, atraso do desenvolvimento, alterações de comportamento, entre outras (OUELLET et al., 1997; SPARLING et al., 2001; DAVIDSON e KNAPP 2007, McCOY et al., 2008; KLOAS et al., 2009; BLAUSTEIN et al., 2011; PELTZER et al., 2013).

Dentre estes agrotóxicos podemos destacar os inseticidas carbamatos (CM), uma vez que estão entre os compostos mais utilizados na agricultura, e seus efeitos tóxicos podem atingir organismos não alvos, alterando não apenas a fisiologia de tais organismos, mas também níveis de organização biológica mais altos como populações e comunidades (MURRAY et al., 2010). O carbaril é um biocida CM, de nome químico 1-naftil metilcarbamato ou metilcarbamato de naftila (C₁₂H₁₁NO₂). Apresenta amplo espectro de toxicidade e é considerado um dos biocidas mais populares do mundo no controle de pragas. É classificado pela ANVISA (2010) com risco entre alto e moderado, causando alterações bioquímicas, estruturais e comportamentais, especialmente via inibição de esterases (BHAVAN e GERALDINE, 2000; 2009).

Por serem compostos cuja toxicologia já é bem conhecida, os CMs podem ser considerados ótimos compostos modelos para a avaliação da vulnerabilidade de espécies animais frente alterações em fatores ambientais, como a temperatura. Como classicamente esses compostos causam a inibição de esterases nos animais (CAJARAVILLE et al., 2000; LIMA et al., 2013), pode-se estudar até que ponto o aumento gradativo da temperatura da água pode exercer um aumento nesses efeitos, ou seja, uma inibição mais significativa das esterases.

Tendo em vista o aumento significativo da temperatura por conta do aquecimento global nos últimos anos, e a alta relação que os anfíbios anuros tem com a temperatura por conta de sua



fisiologia e hábitos de vida (HADDAD et al., 2008), além da relação que os pesticidas possuem com o declínio de espécies de girinos no planeta, os objetivos desse trabalho foram: i) padronizar e otimizar métodos de avaliação cinética e por eletroforese em gel de poliacrilamida das atividades da AChE e CbE no fígado de girinos de rã touro, ii) avaliar a suscetibilidade in vivo e in vitro da AChE e CbE à inibição pelo inseticida carbaril e iii) avaliar a influência da temperatura na atividade da AChE e CbE hepática dos girinos, concomitantemente à exposição ao inseticida carbaril.

2 METODOLOGIA

Experimentos de exposição

Os animais usados nesse projeto, girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*), foram fornecidos pela FUNPIVI-FURB no dia 15 de outubro de 2018. Os espécimes foram transportados em sacos plásticos contendo água do local da coleta até as dependências do Centro de Estudos em Toxicologia Aquática (CETAq), onde ficaram aclimatando por 7 dias. Durante a aclimação, os organismos foram dispostos em caixa de polietileno (nas dimensões: 54 cm de altura x 75 cm de diâmetro) com capacidade de 310 L com fotoperíodo natural, aeração constante e foram alimentados ad libitum uma vez por dia com pellets de ração comercial de peixe contendo os seguintes níveis de garantia (em 100g): proteína, 30 g, umidade 8 g, cálcio 2,5g e material mineral 10g. A água utilizada foi reconstituída seguindo as orientações descritas na ABNT NBR 15008 (Ecotoxicologia aquática – Toxicologia aguda – Método de ensaio com peixes (Cyprinidae) com pH de 7,0 a 7,6 e dureza total de 40 a 48 mg CaCO₃/L-1. A temperatura média no período foi de 24,15 °C ± 0,99 (média ± desvio padrão) e o oxigênio dissolvido de 6,63 mg/L ± 0,71.

Após o período de aclimação os girinos (N=54) foram pesados em balança digital (MARTE AD2000) e medidos (paquímetro digital precisão de 0,01 mm, DIGIMESS). Em seguida foram aleatoriamente distribuídos em aquários de vidro contendo 2L de água reconstituída (1 girinos por

aquário) e 6 réplicas por tratamento. Durante o período experimental o fornecimento de ração foi diário na quantidade de 0,1 g por aquário.

Os aquários permaneceram em banho dispostos em tanques com capacidade de 310 L para controle da temperatura com o auxílio de termostatos autorregulados. A temperatura dos tanques teve seus valores registrados diariamente para possíveis variações durante o período experimental.

Além disso os girinos foram expostos a duas concentrações do inseticida: 10, 100 µg/L -1. O contaminante foi dissolvido em uma solução estoque em 1 mL de acetona e depois adicionada (concentração de 0,0001%) nos aquários. Os grupos controle também receberam o mesmo volume de acetona para evitar ambiguidade interpretação dos resultados devido a possíveis efeitos do solvente.

O ensaio foi semi-estático com renovação da água e reaplicação do herbicida a cada 48 horas. Dados de pH, oxigênio dissolvido (mgO₂.L-1) e NH₃ (mg/L) foram monitorados ao longo do ensaio. O comprimento (cm) dos girinos usado no estudo (N = 54) foi 9,5 ± 0,78 (média ± desvio padrão) enquanto o peso corporal (g) foi de 6,84 ± 1,19. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB) sob o protocolo nº 015/18.

Após o período de exposição (10 dias) os animais foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína (0,5g/L-1). Após os girinos foram mortos por secção medular para remoção do fígado, sendo imediatamente armazenados em nitrogênio líquido para análises posteriores.

Análise cinética da atividade das esterases

Para as análises da atividade de esterases, ~100 mg do fígado foram homogeneizados na proporção 1:4 (m/v) de tampão Tris 0,1 mol/L, pH 8,0, e centrifugados por 30 minutos a 10.000 g a 4° C. A fração sobrenadante, foi coletada e congelada em nitrogênio líquido, sendo realizada uma duplicata para cada amostra.



A atividade das esterases por espectrofotometria foi medida e caracterizada nos extratos preparados, utilizando a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), que monitora a formação do produto da enzima pela reação com o 5'-ditiobisnitrobenzeno (DTNB), em 412 nm por 1 min. Para as medidas da AChE e CbE, foram usados, respectivamente, os substratos acetil-tiocolina e feniltioacetato. Diferentes concentrações de substrato e, volumes de amostra foram testados de modo a se otimizar os ensaios das enzimas, sendo estes apresentados nos resultados do relatório.

Os ensaios com amostras do experimento in vivo foram conduzidos nas mesmas temperaturas utilizadas no protocolo experimental (20, 25 e 30 °C). A atividade da enzima foi expressa como U/mg proteína; onde 1 U é a quantidade de enzima hidrolizando 1 µmol de substrato por minuto. Proteínas foram determinadas de acordo com Bradford (1976).

Testes de inibição in vitro das esterases pelo pesticida carbamato

Após o estabelecimento das condições ótimas de ensaio da AChE e CbE, foram feitos testes de inibição in vitro das esterases. Para tanto, amostras dos extratos protéicos foram incubadas (100 µL) com concentrações crescentes do pesticida CM carbaril: 0, 0,01, 0,1, 1 e 10 mM, sendo feitas duas réplicas para cada concentração. Após a adição dos tratamentos, as amostras permaneceram incubando por 30 minutos para que ocorresse a inibição das enzimas, e então as atividades enzimáticas foram medida no espectrofotômetro, conforme descrito no item anterior.

Análises estatísticas

Inicialmente foi aplicado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (Levene) para todos os dados obtidos. Para dados paramétricos foi aplicado Anova One-Way seguido do teste de Fisher LSD. No caso de dados não normais ou não homogêneos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls.

Diferenças significativas foram aceitas somente para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com ajuda do programa Statistica 7.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mortalidade e dados gerais dos girinos ao longo dos experimentos de exposição in vivo

A mortalidade no período experimental foi de 1,85% (um animal). O peso medio final foi de $7,88 \pm 1,40$ e comprimento total médio de $9,70 \pm 5,37$ cm (Tabela 1). Todos os girinos tiveram avanço nos estágios de desenvolvimento apresentado distribuição entre os estágios 29 (mais jovem) e 37 (maior desenvolvimento).

Tabela 1 – Dados biométricos dos animais utilizados no experimento de exposição in vivo ao carbaril.

Grupo	T (°C)	N	Peso inicial (g)	Comp. inicial (cm)	Peso final (g)	Comp. final (cm)
Controle	20	6	$6,8 \pm 1,0$	$9,2 \pm 1,3$	$7,2 \pm 1,2$	$9,4 \pm 3,8$
10		6	$7,2 \pm 1,4$	$9,5 \pm 1,0$	$8,3 \pm 1,9$	$9,2 \pm 6,1$
100		6	$7,1 \pm 1,0$	$9,2 \pm 0,5$	$8,5 \pm 1,1$	$9,6 \pm 4,3$
Controle	25	6	$6,3 \pm 0,8$	$9,7 \pm 0,4$	$7,3 \pm 1,7$	$10,1 \pm 4,3$
10		6	$6,1 \pm 0,6$	$9,1 \pm 0,6$	$6,8 \pm 1,2$	$9,5 \pm 2,2$
100		6	$7,1 \pm 1,0$	$9,5 \pm 0,5$	$7,9 \pm 1,5$	$9,9 \pm 5,2$
Controle	30	6	$7,2 \pm 1,9$	$10,0 \pm 0,9$	$8,1 \pm 2,4$	$9,8 \pm 3,1$
10		6	$8,3 \pm 1,00$	$10,2 \pm 0,4$	$8,8 \pm 1,0$	$10,2 \pm 3,7$
100		6	$7,2 \pm 0,8$	$9,5 \pm 0,4$	$7,88 \pm 0,7$	$9,79 \pm 3,5$



Otimização das condições de ensaio da atividade da AChE e CbE

Efeito do tampão Tris x Fosfato

Primeiramente testou-se o melhor tampão para ensaio da atividade das esterases. Segundo o método de Ellman et al. (1961), a amostra contendo enzima atua hidrolisando o substrato gerando um produto contendo enxofre livre que, ao reagir com o DTNB, se torna amarelado, permitindo monitorar a cinética de hidrólise do substrato em 412 nm. Essa reação é ótima em pH próximo de 8 (LEITE et al., 2010). Neste sentido, poderia-se utilizar tanto um tampão fosfato (tamponamento entre pH 6 a 8) quanto tampão Tris (tamponamento entre 7 a 9). A princípio, o tampão Tris seria mais adequado por tamponar melhor a solução no pH próximo de 8. Porém, o tampão Tris em pH 9,0 mostrou acelerar a taxa de hidrólise espontânea do substrato, ou seja, quando colocados apenas o substrato e o DTNB na ausência da amostra em tampão Tris 0,1 M pH 8,0, houve elevada cinética de hidrólise espontânea do substrato ao longo do tempo (dados não mostrados). Já a mesma reação, sem amostra, e em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 8,0 interferiu menos da reação, gerando uma taxa de hidrólise espontânea do substrato bem mais baixa. Deste modo, optamos por adotar o tampão fosfato 0,1 M em pH 8,0 para proceder as análises das atividades das esterases nos testes subsequentes.

Efeito da concentração do substrato.

Inicialmente utilizamos condições padrão usadas por e Leite et al. (2010) em outras espécies de girinos, como ponto de partida: 1 mM de acetiltioacetato ou 4,5 mM finais de feniltioacetato, respectivamente como substratos para AChE e CbE, 1 mM de DTNB e 10 μ L da amostra, em um volume final de 1 mL. Com base nos resultados cinéticos obtidos no espectrofotômetro, primeiramente ajustamos o volume de amostra de forma a serem obtidas variações de absorvância por minuto próximas de 0,2 (dados não mostrados), conforme sugerido por Vioque-Fernandez et al. (2007). Segundo esses

ajustes, ficaram estabelecidos os volumes de amostra de 30 μ L de amostra para a medida da atividade da AChE, e 1 μ L (na verdade 10 μ L da amostra diluída 1:10) para a CbE.

Uma vez ajustados os volumes de amostra, seguiram-se testes para estabelecer as concentrações de substrato a serem utilizadas para as amostras dos experimentos in vivo e in vitro. Esse ajuste é necessário para definir concentrações altas o suficiente para garantir que a enzima esteja atuando em sua velocidade máxima, porém não excessivamente alta, pois muitas esterases de espécies aquáticas, por vezes, apresentam inibição da enzima pelo excesso do substrato (VIOQUE-FERNANDEZ et al., 2007). Conforme mostrado na figura 1, na medida em que se aumenta a concentração do substrato, inicialmente a atividade da enzima aumenta linearmente, até ir atingindo certa saturação. Não foi observada inibição da AChE ou da CbE pelo excesso de substrato. Conforme os dados da figura, foram selecionadas as concentrações de 2 mM de acetiltioacolina como substrato para a AChE, e de 6 mM do feniltioacetato para a CbE, para as análises posteriores.

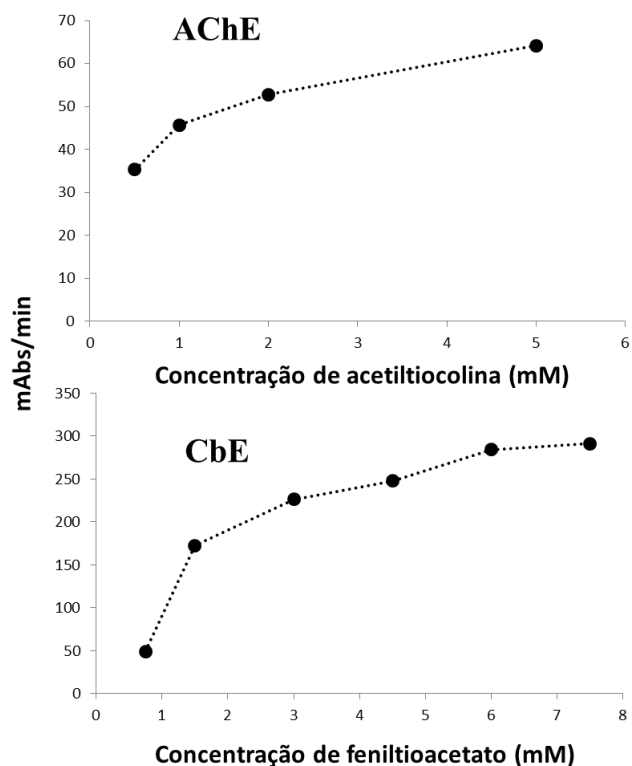


Figura 1 - Efeito da concentração do substrato na atividade da acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) de fígado de girinos de rã touro.

Avaliação do efeito in vitro do carbaril na atividade das esterases dos girinos

De forma a averiguar a capacidade do carbaril em inibir as esterases dos girinos, foram feitos testes in vitro de incubação dos extratos protéicos dos fígados dos girinos com diferentes concentrações do carbaril. Os resultados são mostrados na figura 2, indicando que houve inibição significativa e dose-dependente tanto da AChE como da CbE. Ainda, os dados mostram que a atividade da AChE foi bastante mais sensível à inibição pelo carbaril que a CbE: enquanto ~80% da atividade da AChE foi inibida já com 0,01 mM do carbaril, apenas ~10% da CbE foi inibida na mesma concentração do carbamato, necessitando de 100 vezes mais (1

mM) do carbaril para inibir os mesmos 80% da atividade da CbE.

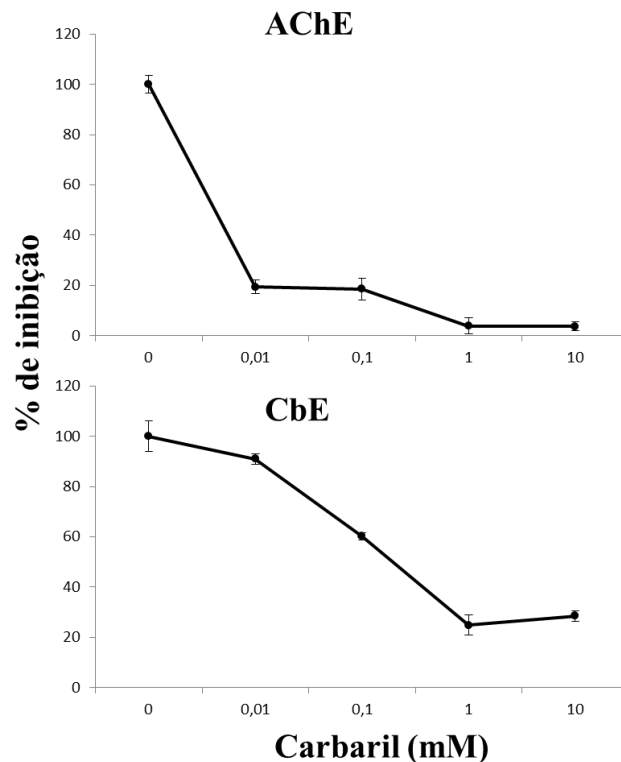


Figura 2 – Efeito in vitro de concentrações crescentes do inseticida carbaril na atividade da acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) de fígado de girinos de rã touro.

Efeitos in vivo do carbaril nas esterases dos girinos, sob diferentes temperaturas

A figura 3 apresenta dos resultados das atividades da AChE e CbE no fígado dos girinos controle, expostos a 10 µg/L de carbaril, e expostos a 100 µg/L de carbaril, por 10 dias, nas temperaturas de 20, 25 e 30 oC. Como pode ser observado, nenhum dos tratamentos com carbaril, nas diferentes temperaturas ocasionou inibição da AChE ou da CbE. Por outro lado, os animais expostos a 100 µg/L de carbaril a 25 oC apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da CbE. Interessantemente, os animais controles e tratados a 30 oC apresentaram



atividade da AChE menor do que os animais controle e tratados a 25 oC, evidenciando um efeito da temperatura na atividade dessa enzima; não sendo evidente nenhum efeito similar da temperatura na atividade da CbE.

A diminuição da atividade da AChE nos animais mantidos na maior temperatura poderia sugerir um decréscimo da atividade colinérgica dos animais. Essa enzima atua clivando a acetilcolina nas sinapses nervosas e junções neuromusculares, tendo papel importante na contração muscular e comunicação nervosa, especialmente no sistema nervoso autonômico. Assim, a diminuição da atividade dessa enzima poderia ser um reflexo de uma menor produção ou geração de acetilcolina no fígado, órgão avaliado no estudo, podendo indicar um efeito da temperatura na atividade parassimpática dos animais.

Entretanto, ainda que não seja conhecida totalmente, mesmo em humanos, a função das colinesterases hepáticas, estas têm sido utilizadas como biomarcadores séricos para problemas hepáticos em doenças humanas, tais como cirrose e hepatite (RAMACHANDRAN et al, 2014). Lesões no fígado devido a efeitos tóxicos ou sobrecarga metabólica, fazem com que haja perdas da enzima para a corrente sanguínea, elevando a atividade sérica da AChE. Por esse motivo, a medida da atividade da AChE no soro de humanos, tem sido sugerida como marcadora para problemas hepáticos, apresentando correlação significativa e negativa com os níveis de albumina e pró-trombina (MENG et al., 2013). Dessa forma, podemos sugerir que, no presente estudo, a diminuição da atividade da AChE no fígado possa ter relação com uma sobrecarga de atividade metabólica do fígado, em função da temperatura elevada, tornando os animais metabolicamente mais ativos (maior consumo energético).

A ausência de inibição das esterases pelo carbaril contrasta com outros estudos presentes na literatura científica; entretanto isso pode ser explicado pela concentração utilizada. Ainda que concentrações próximas a 1 mg/L de carbaril possam ser encontradas em locais altamente

contaminado, as mesmas em geral não ultrapassam valores de $\mu\text{g/L}$. Nesse contexto, a maior parte dos estudos sobre efeito de carbamatos em animais aquáticos, referem-se a exposições a concentrações maiores que 1 mg/L, o que justifica a inibição das esterases. Por exemplo, Vioque-Fernandez et al. (2009) expôs carangueijos americanos (*Procambarus clarkii*) a 1 e 2 mg/L de carbaril, tendo observado inibição significativa da CbE (mas não da AChE) após 7 dias de exposição. Em girinos de *Rhinella arenarum* expostos a 3 e 6 mg/L por 48 h, Ferrari et al. (2011) também observaram uma forte inibição da AChE. Apesar de não termos observado inibição in vivo de nenhuma das esterases no presente estudo, há que se considerar que utilizamos concentrações mais ambientalmente realísticas, demonstrando que as esterases do fígado da rã touro são pouco afetadas pelo carbaril, considerando cenários de contaminação moderada por esse composto.

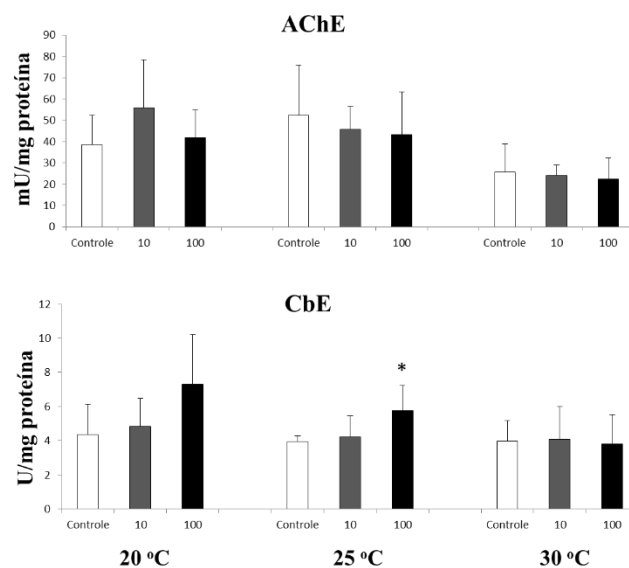


Figura 3 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) de fígado de girinos controle e expostos a 10 ou 100 mg/L do inseticida carbaril, por 10 dias, a 20, 25 e 30 oC. O



símbolo “*” indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente trabalho serviu para se obterem condições ótimas para avaliação cinética das atividades da AChE e CbE em fígado de girinos de rã touro. Ainda que essas enzimas sejam classicamente utilizadas como biomarcadoras para exposição à inseticidas carbamatos e organofosforados, e que a rã touro seja um animal modelo amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos, a caracterização de suas esterases, até o presente, não havia sido realizada. Assim o trabalho contribuiu para o estabelecimento de protocolos otimizados para análise dessas enzimas nos animais, e para melhor compreensão dos efeitos in vivo e in vitro do inseticida carbaril, nessas mesmas enzimas. Os estudos in vitro demonstraram que as enzimas são suscetíveis à inibição pelo carbaril, sendo a AChE mais sensível à inibição que a CbE. No entanto, in vivo, considerando as concentrações utilizadas, as esterases hepáticas não foram afetadas, após 10 dias de exposição, o que sugere a tolerância dessa espécie ao carbaril, considerando cenários de contaminação relativamente moderada. Como consideração final, os testes realizados até o encerramento da vigência da bolsa com géis de poliacrilamida com corantes específicos para identificação de bandas esterásicas, não foram conclusivos. Os testes continuarão sendo feitos, com previsão de que num prazo de até 2 semanas tenhamos condições otimizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias de Produtos Agrotóxicos. ANVISA, 2010
2. BLAUSTEIN, A.R.; HAN, B.A.; RELYEA, R.A.; JOHNSON, P.T.J.; BUCK, J.C.; GERVASI, S.S.; KATS, L.B. (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* .v.1223. p108-119.
3. BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*. p. 331-339, 2000.
4. BHAVAN, P.S.; GERALDINE, P. Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Journal of Environmental Biology*, 2009
5. BOSCH, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*, v.16, p. 56-73.
6. CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*. v. 247, p. 295-311, 2000
7. CUNHA, N.R.S; LIMA, J.E.; GOMES, M.F.M; BRAGA, M.J. (2008). A Intensidade da Exploração Agropecuária como Indicador da Degradação Ambiental na Região dos Cerrados, Brasil. *RER, Piracicaba, SP*, vol. 46, nº 02, p. 291-323.
8. DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. (1994). *Biology of amphibians*. 2.ed. Baltimore and London: McGraw-Hill, p. 670.
9. DAVIDSON, C.; KNAPP, K.A. 2007. Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecol Appl* 17:587-597



10. ELLMAN, G.L. ET AL. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, v. 7, p. 88-95, 1961.
11. FERRARI, A.; LASCANO, C.; PECHEN de D'ANGELO, A.M.; VENTURINO, A. 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol C* 153(1):34-9.
12. FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. 2017. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>
13. FRYDAY, S.; THOMPSON, H. 2012. Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. EFSA Supporting Publications: EN-343-348
14. GOSNER, K., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183-190
15. HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. (2005). Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, v. 55, n. 3, p.207-217.
16. HADDAD, C.F.B.; GIOVANELLI, J.G.R. & ALEXAN DRINO, J. 2008. Oaquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. Pp. 195-206. In: M.S. Buckeridge (Ed.) *A biologia e as mudanças climáticas no Brasil*. RiMa Editora, São Carlos. 316p.
17. HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.;
18. GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. (2013). Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica - Diversidade e Biologia. Anolis Books Editora, 1ª edição, p. 544.
19. HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. (2010). Atrazine induce complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.v.107.n.10. p. 4612- 4617.
20. KLOAS, W.; LUTZ, I.; SPRINGER, T.; KRUEGER, H.; WOLF, J.; HOLDEN, L.; HOSMER, A. 2009. Does Atrazine Influence Larval Development and Sexual Differentiation in *Xenopus laevis*? *Global Change Biol* 17: 657-666.
21. MENG, F.; YIN, X.; MA,X.; GUO,X.D.; JIN, B.; LI, H. 2003. Assessment of the value of serum cholinesterase as a liver function test for cirrhotic patients. *Biomed Rep* 1(2): 265-268.
22. LEITE, P.Z.; MARGARIDO, T.C.S.; LIMA, D.; ROSSA-FERES, D.; ALMEIDA, E.A. 2010. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environ Sci Pollut Res* 17:1411-1421.
23. LIMA, A.V.B.; GUERRA, A.L., ALMEIDA, E.A.; TADDEI, F.G.; CASTIGLIONI, L. Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (Palaemonidae). *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 47, p. 132-138, 2013.
24. MARGARIDO, T.C.S. 2008. Caracterização de esterases em girinos de diferentes



espécies após exposição in vitro à Clorpirifos, pesticida organofosforado. Monografia de conclusão de curso de graduação em Química Ambiental. UNESP.

25. MCCOY, K.A.; BORTNICK, L.J.; CAMPBELL, C.M.; HAMLIN, H.J.; GUILLETTE, J.R.; MARY, C. 2008. Agriculture Alters Gonadal Form and Function in the Toad *Bufo marinus*. *Environ Health Persp* 116: 1526-1532.
26. MURRAY, K.E.; THOMAS, S.M.; BODOUR, A.A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*. v. 158, p. 3462-3471, 2010
27. OUELLET, M.; BONIN, J.H.; RODRIGUES, J.; DEGRANGES, J.; LAIR, S. 1997. Hindlimb deformities (Ectromelia, Ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J Wildl Dis* 33: 95-104.
28. PELTZER, P.M.; JUNGES, C.M.; ATTADEMO, A.M.; BASSO, A.; GRENON, P.; LAJMANOVICH, R.C. 2013. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. *Ecotoxicology* 22:1165-1173.
29. RAMACHANDRAN, J.; SAJITH, K.G.; PRIVA, S.; DUTTA, A.K.; BALASUBRAMANIAN, K.A. 2014. Serum cholinesterase is an excellent biomarker of liver cirrhosis. *Trop Gastroenterol* 35(1):15-20.
30. RELYEA, R.A. (2009). A Cocktail of Contaminants: how Mixtures of Pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*.v.159.p.363-376.
31. SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARCIA, P. C. A.;
32. GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LANGONE, J. (2012) Brazilian amphibians – List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2016. Disponível em: <[HTTP://www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)>. Acesso em: jan. 2019.
33. SILVANO, L.D. & SEGALLA, V.M. (2005). Conservação de anfíbios no Brasil. *MEGADIVERSIDADE*, V. 1, n. 1, p. 80-86.
34. VIOQUE-FERNANDEZ, A.; ALMEIDA, E.A., LÓPEZ-BAREA, J. 2009. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers* 14(5):299-310.
35. VIOQUE-FERNANDEZ, A.; ALMEIDA, E.A., LÓPEZ-BAREA, J. 2007. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp Biochem Physiol C* 145: 404-412.