

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
IFSP- *campus* Barretos

Gabriela de Almeida Toledo Martins

Caracterização do metabolismo de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) submetido à dose sub-letal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas

Barretos - SP

2018

Gabriela de Almeida Toledo Martins

Caracterização do metabolismo de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) submetido à dose sub-letal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Comissão de Pesquisa do IFSP - Barretos, sob orientação do Professor Dr. Rodrigo Yamakami Camilo como requisito para aprovação no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Barretos, 2018

M379c Martins, Gabriela de Almeida Toledo

Caracterização do metabolismo de *Lithobates Catesbeianus*
(SHAW, 1802) submetido à dose sub-letal de cromo hexavalente
por 24 ou 48 horas / Gabriela de Almeida Toledo. – 2018.
25 f. : il.; 30 cm

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências
Biológicas) - Instituto Federal de São Paulo - Campus Barretos,
2018.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Yamakami Camilo

1.*Lithobates Catesbeianus*. 2.Cromo hexavalente. 3.Metabolismo.
I. Título

CDD: 577

RESUMO

Diversos fatores ambientais podem causar efeitos nocivos no comportamento, fisiologia e até mesmo em padrões genéticos, o que pode levar a alterações no tamanho das populações dos organismos. Neste contexto, características específicas dos anfíbios, como permeabilidade da pele e ciclo de vida dependente tanto do ambiente aquático quanto do terrestre, os tornam muito vulneráveis às variações ambientais, dando a esses animais *status* de marcadores da qualidade do ambiente. Dentre os contaminantes aquáticos potencialmente tóxicos estão os metais pesados, como o cromo hexavalente. A presença dessa substância está fortemente relacionada com fatores antrópicos, tais como a queima de combustíveis fósseis, madeira e papel além de seu uso em indústrias de cimento, vidro, aço, galvanoplastia e processamento de couro cru. Neste trabalho foi avaliado o efeito do Cromo (VI) sobre o metabolismo energético em larvas de *Lithobates catesbeianus* (Anura) em condições laboratoriais ambientalmente controladas. Constatou-se que o cromo causa alterações das concentrações teciduais de metabólitos e um desequilíbrio da homeostase sendo necessário para o organismo um maior gasto energético para se reestabelecer frente ao contaminante.

Palavras-chave: *Lithobates catesbeianus*, metal pesado, cromo hexavalente, metabolismo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação de girinos por recipiente.....	13
Figura 2: Divisão dos grupos controle, exposição 24 horas e 48 horas.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de metabólitos em fígado de <i>Lithobates catesbeianus</i> submetido à dose subletal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas.....	17
Tabela 2: Concentração de metabólitos em músculo caudal de <i>Lithobates catesbeianus</i> submetido à uma dose subletal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas.....	17
Tabela 3: Concentração de metabólitos em plasma de <i>Lithobates catesbeianus</i> submetido à uma dose subletal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas.	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 COLETA DOS TECIDOS	14
3.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS METABÓLITOS	14
3.3 ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	17
5. CONCLUSÃO.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da atividade industrial a partir da metade do século XX, o crescimento populacional e a intensiva utilização dos recursos naturais, a contaminação do ambiente ocasionada pelos resíduos domésticos e industriais tornou-se um dos graves problemas para a manutenção da qualidade do ambiente (MIRANDA FILHO et al., 2011; MELLO, 2017). Apesar de existirem várias políticas públicas que visam reduzir o impacto causado pela poluição, tais como a inibição do lançamento de resíduos direto no ambiente, o sistema de fiscalização para controlar este tipo de problema ainda é precário, ou seja, a poluição é um fato e põe em risco todos os ambientes, inclusive o dulcícola.

A contaminação por substâncias potencialmente tóxicas é responsável por efeitos adversos no ambiente e nos seres vivos, a toxicidade da substância depende sempre da concentração independentemente do mecanismo de intoxicação (YABE; OLIVEIRA, 1998; AGUIAR, 2002). Segundo Aguiar (2002), a definição de poluição é “qualquer alteração física, química ou biológica que produza modificação no ciclo biológico normal, interferindo na composição da fauna e da flora do meio”. Sendo assim, constantemente a biota aquática está exposta a substâncias tóxicas de natureza orgânica ou inorgânica que são despejadas no ambiente oriundas de atividades industriais e residências (AGUIAR, 2002; MELLO, 2017; LINS, 2010).

A presença de contaminantes no ambiente aquático, mesmo em concentrações inferiores as que causam mortalidade, influenciam os parâmetros fisiológicos dos organismos em um ecossistema e, sendo assim, as espécies respondem organicamente de diferentes modos, tendo efeitos tóxicos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (GOMES, 2013). Grande parte dessas substâncias é potencialmente citotóxica, genotóxica ou carcinogênica, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e os metais pesados.

Naturalmente, a presença de metais pesados nos sistemas aquáticos ocorre devido a processos geoquímicos, como o erosão e intemperismo das rochas e a lixiviação do solo, porém esses processos introduzem a liberação de pequenas concentrações dessas substâncias nos ecossistemas. Antropogenicamente, a presença de metais pesados está associada a atividade mineradora, efluentes industriais, comerciais e domésticos sem tratamento, insumos agrícolas e queima de combustíveis fósseis que adicionam grandes quantidades desses metais no ambiente

(FILHO, 2015; MASSUTI, 2004; MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2008; SOUZA, 2015; ROCKER, 2015).

A diferença da origem dos metais pesados no ambiente, segundo Ribeiro (2007) “reside na magnitude do impacto, na frequência e na duração em que ocorre a distribuição e contaminação pelos metais, ocasionando impactos consideráveis na estrutura e funcionamento dos ecossistemas”. Santana e Barroncas (2007) apontam que “uma vez no ecossistema aquático, os metais pesados são distribuídos nos diversos compartimentos do ambiente, como solo, sedimento, plantas e animais”.

Os metais pesados têm despertado grande interesse nas pesquisas da área ambiental, por não serem biodegradáveis e pelo fato de, na maioria das vezes, o meio aquático tornar-se o destino final para esses poluentes metálicos (CONDESSA, 2014) além de estarem ligados a uma série de processos deletérios, tais como neurotoxicidade, distúrbios hematológicos, distúrbios renais, hipertensão arterial, carcinogenicidade, diminuição da fertilidade (RUPPENTHAL, 2013), malformações congênitas, redução na ingestão de alimentos, letargia e diminuição no tamanho (SILVA, 2001) nos seres vivos.

Respostas biológicas a estímulos ambientais também são descritas como fatores responsáveis por alterações nos mecanismos moleculares, mudanças histopatológicas (representando um indicativo de ação cumulativa de estressores exógenos a um organismo específico) e disfunções celulares em animais expostos a poluentes. Em diversos organismos aquáticos, alterações histopatológicas por exposição a níveis relativamente baixos de poluição têm sido claramente demonstradas, seja em laboratório ou campo (BUENO-GUIMARÃES et al., 2001). Ossana e colaboradores (2010) em estudos com *Lithobates catesbeianus* expostos ao cobre observaram que há uma redução da sensibilidade e um leve aumento da frequência de eritrócitos com micronúcleos. Somado a isto, há uma redução e/ou inibição da metamorfose e do crescimento em *Rana limnocharis* (PATAR et al., 2016) e *Pleurodeles waltl* (FLAMENT et al., 2003) exposto ao cádmio ou ao cátion de cádmio.

Embora alguns metais sejam micronutrientes e sejam encontrados normalmente nos seres vivos (ferro, cádmio, zinco, arsênio, vanádio, cobre e cromo, entre outros), a exposição prolongada a altas concentrações pode induzir dano genotóxico e teratogênico (GARCIA-RODRIGUEZ, 2014). Em larvas de *Xenopus laevis* expostos ao cádmio, observou-se malformação cardíaca e da notocorda e teratogênese do olho, da face, do trato digestório (SUNDERMAN; PLOWMAN; HOPFER, 1991).

Nos ambientes aquáticos, o impacto dos metais pesados pode ser em escala local ou de maior abrangência devido ao carreamento dessas substâncias pela água, alguns metais, quando em solução apresentam, espécies químicas estáveis que resultam em uma acumulação na coluna d'água atingindo concentrações relativamente elevadas (SOUZA, 2015; LACERDA; MALM, 2008). Dessa forma, no ambiente aquático, todos os organismos estão expostos aos metais e o mecanismo de assimilação dessas substâncias pelos organismos de diferentes níveis tróficos varia da ingestão de apenas íons em solução até metais incorporados em material biológico sólido (MASUTTI, 2004). Os metais pesados podem ser bioacumulados pelos organismos expostos a um ambiente contaminado e conseqüentemente são incorporados na cadeia trófica (LINS, 2010; MELLO, 2017).

Dentre os metais pesados que apresentam uma importância significativa como poluentes, podemos destacar o cromo (Cr). Este elemento, que ocorre naturalmente em rochas, animais, plantas e no solo, principalmente, na forma de íons com valência +2, +3 e +6, é utilizado em diversos processos industriais (MIRANDA FILHO et al., 2011). As formas mais importantes para a saúde humana são o Cr^{3+} (cromo trivalente), essencial para o metabolismo e o Cr^{6+} (cromo hexavalente), potencialmente tóxica, pois é carcinogênica e mutagênica. Seu uso nas indústrias está relacionado com a resistência à corrosão, sendo empregadas em ligas metálicas ácido-resistentes, tintas anticorrosivas, em operações de cromagem (ácido crômico) e na impregnação de madeira (BOETCHER, 2008; CETESB, 2012).

Cerca de 40% do Cromo está disponível na forma Cr (VI) (cromo hexavalente) e a sua presença nos ambientes aquáticos está fortemente relacionada com fatores antrópicos (CETESB, 2012), tais como a queima de combustíveis fósseis, madeira e papel (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1988), produção da liga ferrocrômio, refino de minério e seu tratamento químico (CETESB, 2012). Além de seu uso em indústrias de cimento, vidro, aço, galvanoplastia e processamento de couro cru (GOYER, 1996), este íon também é proveniente da fabricação de cimento, fundições, soldagem, lixos urbanos e industriais, incineração e da utilização de fertilizantes (GOMES, 2013).

O cromo é um elemento bioativo e seu efeito na biota aquática pode ter uma resposta diferente dependendo do organismo, essa variedade de respostas dos organismos aos contaminantes servem como parâmetros de bioindicação do contaminante nos ambientes aquáticos (MELLO, 2017; SOUZA, 2015). Os compostos de Cr (VI) penetram facilmente pelas membranas celulares através de sistemas de transporte de ânions. No interior da célula ele é reduzido a Cr (III)

por tióis, tais como glutatona e cisteína, e monooxigenases dependentes de citocromoP450 (GERHARDSSON; SKERFVING, 1996).

Tradicionalmente a avaliação da qualidade da água é realizada por uma combinação de indicadores físicos, químicos e microbiológicos. Estes índices de poluição são úteis para alertar sobre os riscos para a saúde e para o ambiente e para a determinação das concentrações máximas permitidas. No entanto, a informação adquirida não é completa, visto que as interações bióticas e abióticas não são consideradas (OSSANA; CASTAÑÉ; SALIBIÁN, 2013).

Os bioensaios permitem que as informações físico-químicas sejam complementadas com informações biológicas para determinar as consequências da exposição de um organismo a um poluente ou um conjunto deles. As respostas biológicas, sejam elas bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas e comportamentais, de um organismo após a sua exposição a poluentes são definidas como biomarcadores (EISSA et al., 2009; MAGGIONI et al., 2012). Desta forma, estas respostas podem ser utilizadas como ferramentas sensíveis para avaliar os efeitos adversos de poluentes em populações ou comunidades, visto que evidenciam bem a interação entre um sistema biológico e agentes ambientais físico-químicos (VAN DER OOST et al., 2003; WALKER et al., 2006; CONTI, 2008).

Conforme Pereira (2015), os testes ecotoxicológicos “revelam efeitos deletérios agudos ou crônicos nos organismos causados por um agente tóxico, e permitem avaliar a contaminação de um ambiente por diversas fontes poluidoras, contínuas ou não”. Os resultados desse tipo de teste para contaminantes aquáticos pode atuar “de forma preventiva, evitando efeitos tóxicos, ou de forma reativa, identificando efeitos e contaminantes após a contaminação do ambiente”, conforme Nono e Magalhães (2016). Fernando e colaboradores (2016) demonstraram que há um aumento da mortalidade, um retardo no crescimento e no desenvolvimento e efeitos hemotóxicos e genotóxicos em *Duttaphrynus melanostictus* quando expostos ao cromo hexavalente.

Uma ampla variedade de organismos vivos pode ser utilizada como bioindicadores em testes de biomonitoramento (PEREIRA, 2015). Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis e apresentar alguma resistência na presença do contaminante (LINS, 2010), responder a pequenas alterações do ambiente, ser de fácil aquisição e identificação (PEREIRA, 2015). Para melhor compreensão e interpretação dos resultados é indicado escolher um organismo com comportamento, fisiologia e genética razoavelmente elucidada (MELLO, 2017).

De modo geral, os anfíbios podem ser considerados bioindicadores de qualidade ambiental já que possuem seu ciclo de vida intimamente ligado à água e pele permeável (CONDESSA, 2014). O fato da procriação, desova e fase inicial do ciclo de vida dos anfíbios ocorrer em ambiente aquático, torna estes animais passíveis de contaminação direta (DORNELLES, 2013). Dessa forma, qualquer alteração nas condições de umidade, temperatura, qualidade de água ou mesmo alterações dos habitats disponíveis para alimentação ou refúgio, serão sentidas pelos animais. Essas alterações podem provocar doenças, diminuição das populações ou até extinção de espécies e configura uma das principais causas da redução das populações dos anfíbios ao redor do mundo (POUGH et al, 2008; TOLEDO, 2009). *Rana ridibunda* adultas expostas a contaminação por cromo e cádmio apresentaram acúmulo desses metais no intestino, fígado e principalmente nos rins (LOUMBOURDIS, 2007). Boncompagni e colaboradores (2004) observaram alterações histológicas em *Rana klepton esculenta* exposta a diferentes concentrações de cromo (0,5, 5 e 50 ppm – partes por milhão) durante a fase larval até a metamorfose completa.

As larvas de anfíbios, girinos, são particularmente susceptíveis aos efeitos dos metais pesados no ambiente, uma vez que estes podem causar danos fisiológicos que, por sua vez, induz os organismos a apresentarem respostas compensatórias para reduzir sua letalidade (LINDER; GRILLITSCH, 2000; ROWE et al., 2003). Condições de estresse como alterações bruscas nos padrões do ambiente no qual os anfíbios estão inseridos em função da presença de um agente estressor, podem levar a adaptações compensatórias em busca do equilíbrio dinâmico do animal. Tal estresse pode ocasionar diversos tipos de respostas, desde aumento do cortisol, até diminuição de resistência a doenças, deixando o animal mais suscetível a agentes oportunistas como bactérias e fungos (ROCHA et al., 2010).

Do ponto de vista toxicológico, esse grupo de metais possui uma propriedade química que os distingue em relação aos efeitos no organismo. Possuem a capacidade característica de afetar diferentes órgãos e tecidos do organismo em decorrência dos processos bioquímicos que resultam na afinidade com um ou outro órgão ou tecido (RUPPENTHAL, 2013). Em condições de estresse, o glicogênio serve como uma reserva de energia interna e seus níveis podem ser rapidamente esgotados (BECKER et al., 2009; MOYES; SCHULTE, 2010; SALBEGO et al., 2010). Da mesma maneira, os lipídios também podem ser um substrato para a conversão de energia quando um combustível extra é necessário ou induzido por um estressor, desempenhando, assim, um papel vital durante as alterações bioquímicas sob condições estressantes (CHAMPE; HARVEY, 2006;

GURUSHANKARA et al., 2007; MOYES; SCHULTE, 2010, ZAYA et al., 2011). Sob condições de estresse, a concentração de proteínas teciduais também pode decrescer em consequência do aumento do gasto energético após exposição de poluentes. Isto pode ocorrer devido a uma tentativa de eliminar os compostos tóxicos, para aumentar a síntese de ATP, ou para a formação de lipoproteínas (SALBEGO et al., 2010; SOUNDERRAJ et al., 2011; GANESHWADE, 2012).

Massuti (2004) aponta que os principais locais de ação de metais são as enzimas e as organelas sub-celulares, onde a toxicidade pode causar danos aos sistemas enzimáticos devido a ligações destas com íons metálicos, alterando a configuração tridimensional das enzimas e consequentemente sua função catalítica. A ação dos metais também pode ser inibitória da síntese das enzimas ou pela substituição de um metal co-fator essencial por um metal tóxico.

Os danos causados por metais pesados e os seus efeitos tóxicos oriundos de contaminações devem ser estudados no sentido de ao menos corrigir as degradações impostas ao meio. Os anfíbios formam um grupo de grande importância também na perspectiva ecotoxicológica, pois é um dos grupos de vertebrados que mais sofre com a contaminação do ambiente aquático, e a avaliação ou o monitoramento do ambiente aquático é possível através do estudo de suas respostas fisiológico-bioquímicas. Além disto, os anfíbios também são importantes pelo seu papel biológico e por serem utilizados como fonte direta de alimentação para o homem.

Como há poucos estudos que trazem informações bioquímico-toxicológicas sobre os anfíbios, que permitam a conservação e o desenvolvimento sustentável, a *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) foi escolhida por apresentar valor econômico, pela existência de trabalhos publicados com esta espécie e que por sua aquisição não causar impactos negativos nas populações nativas.

A espécie *L. catesbeianus*, conhecida como rã-touro, pertence à família Ranidae, cuja distribuição original é restrita ao sul de Quebec e Ontário (Canadá) até o Golfo do México (EUA). Possuem pele lisa e extensas membranas entre os artelhos e apresentam no dorso coloração verde bastante variável enquanto no ventre a coloração é branca com nuances acinzentadas, podendo os indivíduos mudar de cor dependendo do ambiente (VIZOTTO, 1984; BURY; WHELAN, 1984).

Atingem a maturidade sexual com cerca de um ano de idade, apresentando em ambientes tropicais dois períodos reprodutivos: um em setembro e outro que compreende o período de fevereiro a abril (VIZOTTO, 1984); enquanto na América do Norte, esta espécie reproduz-se apenas durante o verão (BURY; WHELAN, 1984).

A rã-touro foi introduzida no Brasil em meados da década de 30, no entanto problemas como doenças, predação e baixo preço, levaram ao abandono de raniculturas, ocasionando a liberação dos exemplares na natureza (VIZOTTO, 1984). Seu grande tamanho, chegando a atingir 15 cm, alta mobilidade, hábito alimentar generalista e sua alta capacidade reprodutiva a tornaram uma espécie invasora bem-sucedida e, portanto, uma ameaça à biodiversidade. No seu ambiente natural, por possuir grande porte e comportamento voraz, a *L. catesbeianus* é um importante competidor e predador, e influencia a presença e abundância de outras espécies de anuros (HECNAR; M'CLOSKEY, 1997).

Assim, a rã-touro é considerada um bom modelo animal para experimentos toxicológicos devido às suas características físicas (tamanho e resistência), apresentando girinos grandes em comparação a outras espécies e também por ser um anfíbio anuro modelo com vasta literatura científica e não ameaçado de extinção (ABDALLA et al., 2017).

2. OBJETIVOS

Avaliar o perfil metabólico de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos a uma dose sub-letal de Cr (VI) por 24 horas ou 48 horas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a variação das concentrações de glicose, lactato, triglicerídeos, aminoácidos livres e proteínas totais no músculo esquelético, no fígado e no plasma sanguíneo e de glicogênio no músculo esquelético e no fígado de *L. catesbeianus* submetidos à uma concentração sub-letal de Cr (VI) por 24 ou 48 horas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As larvas da espécie *L. catesbeianus*, foram obtidas no setor de ranicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) *campus* de Jaboticabal, sendo mantidas em caixas de 200 litros e alimentadas durante o período de aclimação.

Para a realização do experimento foi utilizado nove recipientes de vidro com capacidade de três litros. Em cada frasco eram acondicionados três animais (1 animal/litro), sendo um total de 27 girinos utilizados nesse estudo (Figura 1 e 2).

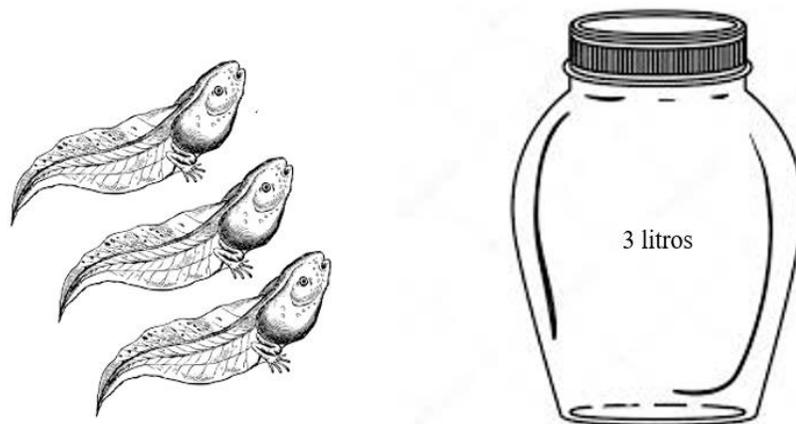


Figura 1: Relação de girinos por recipiente.



Figura 2: Divisão dos recipientes em grupo controle, exposição 24 horas e exposição 48 horas.

Nos recipientes dos grupos de exposição ao cromo continha três litros de uma solução contendo água de clorificada e $K_2Cr_2O_7$ a 18 mg/L (NATALE, 2006). Em três destes recipientes os girinos foram mantidos nesta solução por 24 horas e em outros três recipientes por 48 horas. O grupo controle que também é formado por três recipientes de vidro contendo somente água

declorificada com três animais cada. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 27°C e pH 7,5-8,0 e fotoperíodo de 12/12.

O manuseio e a experimentação animal foram feitos de acordo com as recomendações do Comitê de ética da Universidade Estadual Paulista - UNESP, seguindo o Guia de Cuidados e Uso de Animais em Laboratório e aprovados pelo comitê de ética do IFSP (protocolo número 157/2016 – CEUA).

3.1 COLETA DOS TECIDOS

Após o período de exposição subletal, os animais foram eutanasiados de acordo com os procedimentos recomendados pelo CONCEA para a coleta de plasma, fígado e músculo caudal. Os tecidos coletados foram acondicionados em freezer a -80°C, para as posteriores análises. Foram utilizados para as análises 50mg de fígado e 100mg de músculo caudal.

3.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS METABÓLITOS

A avaliação das concentrações dos metabólitos foi realizada após a homogeneização dos tecidos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro “Genesys 10S UV-Vis”.

- Homogeneização dos extratos neutros: alíquotas de fígado, músculo e coração foram diluídas em água destilada na proporção de 1/10 para quantificação de glicose, triglicerídeos, aminoácidos livres, lactato e proteína. Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador mecânico sob banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 13400xg durante três minutos e os sobrenadantes serão utilizados como extratos celulares.

- Glicose: a quantificação da concentração plasmática de glicose (mg/dL) foi feita com o Kit Labtest de Glicose Liquiform (Ref.:133), cujo princípio é a oxidação enzimática da glicose, e o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonímia vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra analisada, a leitura foi realizada em 525 nm.

- Lactato: a quantificação das concentrações tissulares (fígado e músculo caudal) e plasmática de lactato foram realizadas com o Kit Labtest de lactato enzimático (Ref.:138). Na presença de

oxigênio a lactato oxidase catalisa a oxidação do ácido láctico, promovendo a formação de piruvato e o peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre a reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (TOOS), sob ação catalisadora da peroxidase, formando uma quinonímia, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de lactato na amostra analisada, a leitura foi realizada em 550 nm. Os valores das concentrações tissulares foram expressos em mg de lactato/g tecido e o plasmático sendo os valores expressos em mg de lactato/dL de plasma.

- Glicogênio: a extração do glicogênio tecidual foi realizada segundo Bidinotto e colaboradores (1997). Esse método consiste na precipitação alcoólica do glicogênio seguida pela determinação direta de açúcares redutores totais após hidrólise ácida (DUBOIS *et al.*, 1956). Após a realização da digestão alcalina do tecido analisado em 500 µL de KOH 6N a 100°C por cinco minutos, foi adicionado 1µL de álcool etílico e 50 µL sulfato de potássio 10% (K₂SO₄) em 350 µL deste extrato alcalino para a realização do processo de precipitação alcoólica. Após agitação, o tubo foi centrifugado a 5000 x g por 3 minutos, e o sobrenadante foi descartado, invertendo-se o tubo. O precipitado foi ressuspensão em 1µL de água destilada, o tubo foi agitado e as amostras utilizadas para determinação de glicose pelo método de Dubois (1956). Esta análise consiste na adição de um volume adequado de dissolução a 500µL de fenol 4,1 % e 2,0mL de ácido sulfúrico concentrado, rapidamente adicionado ao meio de reação. Os tubos de reação foram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480 nm. A concentração de açúcares totais é estimada contra um padrão de glicose 1mM e está expressa em µmoles de glicosil glicose/mg de tecido.

- Triglicerídeos: a concentração de triglicerídeos plasmáticos (mg/dL) foi obtida por meio do Kit LabTest de Triglicérides Liquiform, no qual a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Após essa reação, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina, a leitura foi realizada em 505 nm.

- Aminoácidos livres: foram determinados por uma modificação do método de Copley (1941) nos extratos celulares de fígado e músculo caudal. Os extratos neutros foram diluídos em 200µL de água destilada e posteriormente um mililitro de ninhidrina 0,1% (em propanol) foram adicionados à reação. Os tubos de ensaio foram vedados para impedir a evaporação da ninhidrina

e mantidos em banho-maria a 40°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em 570nm contra um padrão 100 μ moles de ácido aminoacético sendo os valores expressos em μ moles/g tecido.

- Proteínas totais: a quantificação da concentração de proteínas totais (mg/dL) foi feita com o Kit LabTest de Proteínas Totais (Ref.: 99), por meio do método de Biureto, que reage com as ligações peptídicas das proteínas séricas, formando cor púrpura, proporcional à concentração das proteínas na amostra analisada, a leitura foi realizada em 545 nm.

3.3 ESTATÍSTICA

A exploração dos dados inclui a identificação de *outliers* e a transformação dos dados usando raiz quadrada, para adequar aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância. Posteriormente foi realizada uma análise de variância de um critério (ANOVA one way), seguido do teste *a posteriori* de Tukey. As análises foram conduzidas no software R versão 2.11.1 (R Development Core Team, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das concentrações de glicose, lactato, glicogênio, triglicerídeos, proteínas e aminoácidos em fígado estão expressos na Tabela 1, em músculo caudal na Tabela 2 e as concentrações de glicose e lactato do plasma na Tabela 3.

Observa-se alterações significativas nas concentrações de glicose, triglicerídeos, proteínas e aminoácidos em fígado, sendo as maiores concentrações encontradas em glicose e aminoácidos no grupo exposto por 24 horas e as menores concentrações foram observadas no grupo exposto por 48 horas. As concentrações de triglicerídeos e proteínas apresentam decréscimo em ambos os grupos experimentais.

Tabela 1: Concentração de metabólitos em fígado de *Lithobates catesbeianus* submetido à dose uma subletal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas.

	Controle	24h	48h
Glicose ¹	28,366 ± 1,596 ^b	32,324 ± 2,148 ^a	22,519 ± 2,981 ^c
Lactato ¹	6,274 ± 1,186	5,792 ± 1,393	4,713 ± 2,146
Glicogênio ²	34,379 ± 6,337	32,694 ± 5,065	25,187 ± 15,662
Triglicerídeos ¹	21,191 ± 5,518 ^a	14,735 ± 2,631 ^b	11,703 ± 3,359 ^b
Proteínas ¹	2,988 ± 0,475 ^a	2,396 ± 0,453 ^{ab}	1,778 ± 0,426 ^b
Aminoácidos ³	67,474 ± 15,649 ^b	99,641 ± 16,342 ^a	44,037 ± 13,722 ^b

Os resultados são expressos na média mais ou menos de pm, letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes.

1 Expresso em mg/dL; 2 Expresso em: µmoles de glicosil glicose/mg de tecido; 3 Expresso em: µmoles/g tecido

Em músculo houve mudanças significativas nas concentrações de glicose, glicogênio, proteínas e aminoácido. Nos grupos expostos por 24 horas ao contaminantes, as maiores concentrações foram encontradas em glicose, glicogênio e aminoácidos e no grupo exposto por 48 horas observou-se redução desses metabólitos. Sendo observado em proteínas um declínio das concentrações em ambos os grupos expostos.

Tabela 2: Concentração de metabólitos em músculo caudal de *Lithobates catesbeianus* submetido à uma dose subletal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas.

	Controle	24h	48h
Glicose ¹	10,801 ± 1,266 ^b	13,254 ± 1,258 ^a	9,524 ± 1,277 ^b
Lactato ¹	0,055 ± 0,002	0,046 ± 0,021	0,055 ± 0,020
Glicogênio ²	6,169 ± 2,068 ^c	7,630 ± 1,871 ^b	11,563 ± 2,785 ^a
Triglicerídeos ¹	9,221 ± 0,600	9,134 ± 1,690	11,305 ± 1,965
Proteínas ¹	0,431 ± 0,027 ^a	0,280 ± 0,020 ^b	0,278 ± 0,035 ^b
Aminoácidos ³	109,766 ± 9,443 ^a	115,031 ± 8,454 ^a	67,688 ± 21,434 ^b

Os resultados são expressos na média mais ou menos de pm, letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes.

1 Expresso em mg/dL; 2 Expresso em: µmoles de glicosil glicose/mg de tecido; 3 Expresso em: µmoles/g tecido

No plasma as concentrações de glicose e lactato apresentaram aumentos no grupo exposto por 24 horas e diminuíram no grupo exposto por 48 horas (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração de metabólitos em plasma de *Lithobates catesbeianus* submetido à uma dose subletal de cromo hexavalente por 24 ou 48 horas.

	Controle	24h	48h
Glicose	1,911±0,368 ^b	2,793±0,535 ^a	1,573±0,667 ^b
Lactato	0,550±0,180 ^b	1,204±0,264 ^a	0,711±0,099 ^b

Os resultados são expressos na média mais ou menos de pm, letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes.

1 Expresso em mg/dL;

A variação da glicemia é um dos indicadores clássicos de respostas fisiológicas em estudos de estresse. A hiperglicemia é geralmente observada em animais expostos a algum tipo de estímulo adverso. Isto possivelmente deva ocorrer para atender a maior demanda de energia necessária para escapar ou para enfrentar uma situação adversa (CRESPI; DENVER, 2005). Desta forma, o aumento da glicemia nos tecidos avaliados do grupo Cr 24h (Tabela 1, 2 e 3), possivelmente, tenha ocorrido em função da exposição ao cromo como uma tentativa de fornecer energia para lidar com a intoxicação. A manutenção da glicemia sanguínea é fundamental a muitos tecidos, tais como o nervoso, por utilizarem preferencialmente glicose como fonte energética.

Conforme mostrado em trabalhos com rã touro contaminados por herbicidas atrazina, glifosato ou quinclorac durante quatro e quatorze dias (DORNELES; OLIVEIRA; 2014) e por cádmio durante quatro e dezesseis dias (ABDALLA et al, 2017), o tecido hepático é o responsável pela manutenção glicêmica a partir da glicogenólise ou da gliconeogênese.

No caso da diminuição significativa das concentrações hepáticas de glicose do grupo Cr 48h, possivelmente ocorreram devido a diminuição significativa dos níveis de glicogênio hepático dos animais estudados, visto que uma das respostas ao estresse consiste no rápido consumo dos níveis de glicogênio para atender às demandas de energia aumentadas e auxiliar os processos metabólicos envolvidos na desintoxicação de poluentes (ALKAHEN, 1996). Esse resultado é semelhante ao de Mello (2017) em experimentos com *Danio rerio* exposto a cromo hexavalente em concentrações 20 e 30 mg/L durante 48 horas, no qual foi observado um decréscimo das concentrações de glicose e glicogênio.

As concentrações de aminoácidos livres no tecido muscular e hepático no grupo exposto por 24 horas (Tabela 1 e 2), provavelmente está associada a utilização deste para a manutenção da glicemia. Conjunto a esse aumento das concentrações de aminoácidos observa-se a diminuição das

concentrações de proteínas dos tecidos muscular e hepático, essa diminuição está relacionada a uma degradação de proteínas para obtenção de aminoácidos.

Os aminoácidos após serem desaminados fornecem corpos cetônicos que podem ser utilizados como fonte de energia, conforme mostrado por Abdalla e colaboradores (2017), já citados, essa mobilização pode estar associada a uma maior demanda energética frente a uma resposta de defesa fisiológica dos grupos expostos frente à contaminação.

As concentrações de triglicerídeos diminuíram no tecido hepático dos dois grupos expostos (Tabela 1), a diminuição desse metabolito pode estar relacionada a utilização de ácidos graxos e glicerol como fonte energética para manter o nível da glicemia alta em momentos de jejum ou quanto a alta demanda energética, como é o caso devido a presença de um agente estressor. Dorneles e Oliveira (2014), já citado, também foi observado a diminuição dos os níveis de triglicerídeos em músculo e em fígado, o que não ocorre nesse trabalho.

Em relações as concentrações de lactato obtidas no músculo e no fígado, não foi observado alterações significativas (Tabela 1 e 2). Esse resultado é corroborado pelo trabalho de Mello (2017), já citado, que aponta duas hipóteses para a baixa produção de lactato sendo uma quando não há alto gasto energético e outra quando as reservas de glicogênio são suficientes para suprir esse gasto, sendo essas possíveis causas pela qual não houve diferença significativa nos níveis de lactato.

A alteração nos níveis de lactato pode ou não ocorrer diante de um estresse químico dependendo da via glicólítica ativada em cada situação, como o lactato o produto final da glicólise anaeróbia este só vai ser produzido se está via for a ativa, nesse caso provavelmente, a via ativa é a glicose aeróbia, portanto, não ocorre a produção do lactato e não se observa uma alteração em suas concentrações (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012).

No plasma, observou-se um aumento na concentração de lactato no exposto por 24 horas e 48 horas em relação ao controle, devido à alta demanda de oxigênio causada pela exposição ao cromo, os organismos podem estar realizando fermentação láctica no musculo, entretanto, não é possível observar isso diretamente nas concentrações de lactato no tecido muscular devido ao dinamismo do processo, constata-se a realização da fermentação láctica pela presença de lactato no plasma. Outra hipótese é que algum tecido não analisado nesse trabalho pode estar fazendo glicose anaeróbica e a presença desse metabolito no plasma é decorrente do transporte do mesmo pelo sangue.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a exposição a uma solução subletal de Cr (VI) por 24 ou 48 horas causa alterações das concentrações teciduais de metabólitos em girinos de *Lithobates catesbeianus*, conseqüentemente, causando um desequilíbrio da homeostase sendo necessário para o organismo um maior gasto energético para se reestabelecer frente ao contaminante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Services, 2000.
- ABBASI, A.S.; SONI, R. **Teratogenic effects of chromium (VI) in environment as evidenced by the impact on larvae of amphibian *Rana tigrina*: implications in the environmental management of chromium**. *Int. J. Environ. Stud.* n. 23, p. 131–137, 1984
- ABDALLA, F. C. et al. Efeito do cádmio no fígado de girinos de rã-touro. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 2, p. 447-471, 2017.
- AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1145-1154, 2002.
- BECKER, A. G. et al. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1734-1739, 2009.
- BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. 2012.
- BOETCHER, M. L. **Cromo: aspectos toxicológicos e ocupacionais**. 2008. Trabalho de conclusão de curso. Ciências Farmacêuticas, FEEVALE, Novo Hamburgo, 2008.
- BONCOMPAGNI, E. et al. Toxicity of chromium and heptachlor epoxide on liver of *Rana kl. esculenta*: A morphological and histochemical study. **Ital. J. Zool.** 71(S2), 163-167, 2004
- BUENO-GUIMARÃES, H. M. et al. Tadpole epithelium test: potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 67, n. 2, p. 202-209, 2001.
- BURY, R.B.; WHELAN, J.A. **Ecology and management of the bullfrog**. U.S. Fish and Wildlife Service Resource. Publication, 1984
- CARDOSO, M. L. **Metais pesados**. 2008. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/quimica/metais-pesados/>>. Acesso em: 05 nov. 2016.
- CASTAÑÉ, P.M.; OSSANA, N.A.; SALIBIÁN, A. Exposición de larvas de *Lithobates catesbeianus* a muestras ambientales: alteraciones de biomarcadores enzimáticos, AbstractsIV **Congreso Argentino de Limnología**, Argentina, p.131, 2008.
- CETESB. **Crômio e seus compostos**. Ficha de informação toxicológica, 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/47/2013/11/cromio.pdf>. Acessado em 05 nov. 2016

CHAMPE, C.; HARVEY, R. A. Metabolismo dos lipídeos complexos e colesterol e metabolismo dos esteróides. **Bioquímica Ilustrada**, 2ª edn. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 199-242, 2006.

CONDESSA, S. S. **Estresse oxidativo causado pelo cromo hexavalente e ação da vitamina C em *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: Characidae) machos adultos e potencial biossortivo da casca de coco verde** (*Cocos nucifera* L.) –2014. 204 f. Tese (Doutorado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

CONTI, M. E. **Biomarkers for environmental monitoring**. In: CONTI, M.E. (ed) Biological monitoring: theory and applications. Wit Press, Southampton, pp 25–46, 2008

DORNELLES, M. F. **Efeito dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**. 2013. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

EISSA, B. L.; OSSANA, N.A.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. **Arch Environ Contam Toxicol** 58: 1032–1039, 2009.

FERNANDO, V. A.K., et al. Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad from exposure to hexavalent chromium, **Aquatic Toxicology**, Volume 177, Pages 98-105, 2016

FLAMENT, S., et al. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). **Aquat Toxicol**. 64 (2), 143e153, 2003.

FILHO, F. J. D. P. et al. **Contaminação por metais traço em águas de microbacias urbanas de Juazeiro do Norte**. In: Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia, 2015. Fortaleza, Ceará.

GANESHWADE, R. M. Biochemical changes induced by dimethoate (Rogor 30% EC) in the gills of fresh water fish *Puntius ticto* (Hamilton). **Journal of Ecology and The Natural Environment**, v. 4, n. 7, p. 181-185, 2012.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, M. C. et al. Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. **Acta Universitaria**, v. 24, n. 2, 2014.

GERHARDSSON, L.; SKERFVING, S. Concepts on biological markers and biomonitoring for metal toxicity. In: Chang, L. (Ed.), **Toxicology of Metals**. Lewis Publishers, London, UK, pp. 81e107, 1996

GOMES, S. S. et al. Efeitos da contaminação aguda de Cromo no copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*. In: **XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**. JEPEX. 2013. UFRPE. Recife-PE.

GOYER, R. A. **Toxic effects of metals.** In: Klaassen CD (ed) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons.** McGraw-Hill, New York, p. 691–735, 1996.

GURUSHANKARA, H. P. et al. Impact of malathion stress on lipid metabolism in *Limnonectes limnocharis*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 88, n. 1, p. 50-56, 2007.

HECNAR, S. J.; M'CLOSKEY, R.T. **Changes in the composition of a ranid frog community following bullfrog extinction.** *American Midland Naturalist*. v. 137, p. 145-150, 1997.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.

LINDER, G.; GRILLITSCH, B. **Ecotoxicology of metals.** In: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds) **Ecotoxicology of amphibians and reptiles.** Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, Florida, 2000.

LINS, J. A. P. N. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LOUMBOURDIS, N.S et al. Heavy metal accumulation and metallothionein concentration in the frog *Rana ridibunda* after 21 exposure to chromium or a mixture of chromium and cadmium. **Environmental Pollution**. v. 145, n. 3, p. 787-792, 2007.

MASUTTI, Mariana Beraldo. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e in situ (experimentos em micro e mesocosmos).** 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MELLO, R. M. **Estudo de alterações no metabolismo de carboidratos do zebrafish (*Danio rerio*) em águas contendo cromo hexavalente.** 2017. Dissertação (Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais) – Universidade La Salle, Canoas, 2017.

MIRANDA FILHO, A. L.; MOTA, A. K. M.; CRUZ, C. C.; MATIAS, C. A. R; FERREIRA, A. P. Cromo hexavalente em peixes oriundos da Baía de Sepetiba no Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação de risco à saúde humana. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 3, p. 200-209, 2011.

MOYES, C. D.; SCHULTE, P.M. **Princípios De fisiologia animal.** Artmed, Porto Alegre, pp 526–571, 2010.

MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: ciências da saúde**, v. 4, n. 1, p. 83-100, 2008.

NATALE, G. S. et al. **Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles.** v. 72, p. 261–267, 2006.

NONNO, C. A; MAGALHÃES, D. P. Comparação da toxicidade de espécies metálicas do Cromo (III e VI), através de testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos. **Revista BioUSU**, v. 2, p. 13-26, 2016.

OSSANA, N. A. et al. Toxicity of waterborne copper in premetamorphic tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 84, n. 6, p. 712-715, 2010.

PATAR, A. et al. Cadmium pollution and amphibianse - Studies in tadpoles of *Rana limnocharis*. **Chemosphere** 144, 1043e1049, 2016.

PEREIRA, M. V. M. **Avaliação da qualidade da água em cinco reservatórios do Rio Iguaçu através de biomarcadores em *Astyanax bifasciatus* (Characiformes, Characidae)**. 2015.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora. 2008.

RIBEIRO, E. V et al. Níveis de contaminação por metais pesados em águas superficiais do Rio São Francisco em Pirapora e sua relação com as atividades industriais. 2007. 101 p. **Monografia - Departamento de Geografia. Universidade Estadual de Montes Claros–UNIMONTES. Minas Gerais, 2007.**

ROCHA, G. C. et al. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 10, p. 891-896, 2010.

ROCKER, C. et al. **Biossorção de íons cromo de solução aquosa sintética e efluente de curtume utilizando macrófitas aquáticas**. 2015.

ROWE, C. L; HOPKINS, W. A.; COFFMAN, V. R. Failed recruitment of Southern toads (*Bufo terrestris*) in a trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effects that may lead to a local population sink. **Arch Environ Contain Toxicol** 40:399–405, 2001.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia**. Universidade Federal de Santa Maria: Rede e-Tec Brasil, 2013. Disponível em: http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos_seguranca/sexta_etapa/toxicologia.pdf>. Acessado em: 05 nov. 2016.

SALBEGO, J. et al. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 3, p. 740-745, 2010.

SANTANA, G. P; BARRONCAS, P. S. R. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus–(AM). **Acta Amazônica**, v. 37, n. 1, p. 111-118, 2007.

SHAW, G.. **General Zoology or Systematic Natural History**. Volume III, Part 1. Amphibia. London: Thomas Davison. 1802

SOUNDERRAJ, S. F L. Effect of systemic pesticide phosphamidon on haematological aspects of common frog *Rana tigrina*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive**, v. 2, n. 6, 2011.

SUNDERMAN Jr., F.W.; PLOWMAN, M.C.; HOPFER, S.M. Embryotoxicity and teratogenicity of cadmium chloride in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. **Ann. Clin. Lab. Sci.** 21 (6), 381e391, 1991.

TOLEDO, L. F. **Anfíbios como Bioindicadores**. In: NEUMANN-LEITÃO, S.; EI-DIER, S. (Orgs.) Bioindicadores da Qualidade Ambiental. Recife: Instituto Brasileiro Pró- Cidadania. Pp. 196-208, 2009.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicol Pharmacol** 13:57–149, 2003.

VIZOTTO, L. D. **Ranicultura**. Ciência e Cultura. v.36, p.42-45. 1984. WALKER, C.H. et al. Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2006.

WALKER, C. H. et al. **Principles of ecotoxicology**. Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chromium**. Environment Health Criteria, Geneva, 1988.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 1998.

ZAYA, R. M. et al. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. **Aquatic toxicology**, v. 104, n. 3, p. 243-253, 2011.