

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

CAIO EDUARDO MESSORA BAGNOLO

**CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS DE RIACHOS DO PARQUE NATURAL
MUNICIPAL DE SERTÃO, RS**

ERECHIM

2022

CAIO EDUARDO MESSORA BAGNOLO

**CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS DE RIACHOS DO PARQUE NATURAL
MUNICIPAL DE SERTÃO, RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
da Universidade Federal da Fronteira Sul,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Teresinha Hartmann

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann

ERECHIM

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bagnolo, Caio Eduardo Messoria
Conservação de anfíbios de riachos do Parque Natural
Municipal de Sertão, RS / Caio Eduardo Messoria Bagnolo.
-- 2022.
80 f.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hatmann
Co-orientador: Doutor Paulo Afonso Hartmann
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2022.

1. Anfíbios. 2. Conservação. 3. Agrotóxicos. 4.
Diversidade. 5. Unidade de conservação. I. Hatmann,
Marília Teresinha, orient. II. Hartmann, Paulo Afonso,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

CAIO EDUARDO MESSORA BAGNOLO

**CONSERVAÇÃO DE ANFÍBIOS DE RIACHOS DO PARQUE NATURAL
MUNICIPAL DE SERTÃO, RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
da Universidade Federal da Fronteira Sul,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 30/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Marília Teresinha Hartmann – UFFS

Orientadora

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann – UFFS

Co-orientador

Prof. Dr. Jairo José Zocche – UNESC

Avaliador

Prof.^a. Dr.^a Noeli Zanella – UPF

Avaliador

Dedico este trabalho aos meus pais, que não
pouparam esforços para que eu pudesse
concluir meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer aos meus pais pelo carinho e compreensão em momentos de dificuldade e falta de comunicação nesses dois anos de mestrado em que não foi possível visitá-los, meu amor por vocês é infinito.

Gostaria de agradecer aos amigos Felipe e Álvaro pelas orientações e conversas aleatórias, a Bruna e Inete pela dedicação nos ensaios laboratoriais.

Queria agradecer a Gabriela uma pessoa que vem se tornando muito importante em minha vida pelas longas conversas, incentivo, carinho e paciência.

Gostaria de agradecer a UFFS e ao programa de pós-graduação pelas instalações, reagentes e disponibilidade do programa de pós-graduação.

Ao meu coorientador, Paulo A. Hartmann pelas conversas, conselhos e orientações muito úteis que me auxiliaram na construção deste mestrado. E a orientadora, Marília T. Hartmann pelos conselhos, conversas e orientações e por ter no processo de seleção, oferecido uma vaga a mais de orientação e acreditou que eu poderia gerar resultados, obrigado professora, vocês dois são inspirações como professores, profissionais e pesquisadores.

“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.”

Charles Darwin 24 November 1859 - *On the Origin of Species*

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Localização do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS), município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, evidenciando a zona de amortecimento e a área total do PNMS.	17
Figura 2 – Vista área do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS), município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, evidenciando a matriz agrícola no entorno do PNMS.	18
Figura 3 - Localização do Parque Natural Municipal de Sertão, município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, evidenciando as áreas amostrais do interior, borda e entorno.	19
Figura 4 - Ambiente do interior do Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul	20
Figura 5 - Ambiente de borda do Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul	21
Figura 6 - Ambiente do entorno Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul	22
Figura 7 – Comprimento rostro cloacal (CRC) e massa de girinos de <i>Aplastodiscus perviridis</i> nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal De Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. I – Interior, B – Borda e E – Entorno. Linha horizontal = median; caixa = quartis; linha vertical = amplitude dos dados	32
Figura 8 – ANE's registradas em eritrócitos de girinos de <i>Aplastodiscus perviridis</i> nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande Do Sul. I – Interior, B – Borda e E – Entorno. Linha horizontal = median; caixa = quartis; linha vertical = amplitude dos dados.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 – Parque Natural Municipal de Sertão e distribuição áreas amostrais. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul	50
Figura 2 – Ambientes de Interior (A), Borda (B) e Entorno (C) do Parque Natural Municipal de Sertão. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul	51
Figura 3 - Número de espécies de anfíbios anuros compartilhadas e exclusivas nos ambientes do Interior, Borda e Entorno. Parque Natural Municipal de Sertão. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.	57

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Agrotóxicos presentes na água com o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método da análise.....	24
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos da água da análise em campo: temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade e pH (média $\pm$ desvio padrão, mínimo e máximo) nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. (* riachos de classe II; ** riachos de classe III e *** riachos de classe IV segundo a classificação do CONAMA 357)	28
Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos da água: a análise em laboratório: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total e fósforo total (média $\pm$ desvio padrão, amplitude) nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.(* riachos de classe II; ** riachos de classe III e *** riachos de classe IV segundo a classificação do CONAMA 357)	29
Tabela 4 – Agrotóxicos detectados por ambiente e área amostral no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$, de acordo com o limite de quantificação do método (LOQ). (<LOQ) indica que o composto está presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método. ...	30
Tabela 5 – Número de indivíduos coletados (N), Comprimento Rostro Cloacal (CRC) e massa com média, desvio padrão, amplitude de girinos de <i>Aplastodiscus perviridis</i> , nos diferentes ambientes do Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.	31
Tabela 6 – Frequência (por 1000 células) das anormalidades nucleares (ANE's) registradas em eritrócitos de girinos de <i>Aplastodiscus perviridis</i> , Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. Número $\pm$ desvio padrão, valores máximos e mínimos.	33

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Famílias, espécies e número de indivíduos de anfíbios anuros por ambiente (Interior, Borda e Entono) e status de conservação (MMA, 2022) registrados em riachos no Parque Natural Municipal de Sertão. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. DR – Espécie dependente de riacho (S –sim, N – não); LC - poupo preocupante; NT - quase ameaçada; EN – em perigo56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celsius
ANE`s	Anormalidades Nuclear de Eritrócitos
B	Ambiente de Borda
BDO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
c-US/cm	Condutividade por Centímetro
CDT	Condutividade
cm	Centímetro
CRC	Comprimento Rostro Cloacal
CTT	Coliformes Termotolerantes
domg/l	Oxigênio dissolvido em gramas por litro
DR	Espécie Dependente de Riacho
E	Ambiente de Entorno
EN	Em Perigo
F	Anova
FF	Fósforo
g	Gramas
H	Índice de Shanon Wiener
ha	Hectare
I	Ambiente do Interior
LARP	Laboratório de Análise de Resíduos e Pesticidas

LC	Pouco Preocupante
LOD	Limite de Detecção do Método
LOQ	Limite de Quantificação do Método
mm	Milímetros
Mn	Micronúcleo
N	Número
NMP	Número Mais Provável
NT	Quase Ameaçado
NTg	Nitrogênio
OD	Oxigênio Dissolvido
p	Probabilidade
P/L	Por Litro
PAR	Protocolo de Avaliação Rápida
PET	Polietileno Tereftalato
PNMS	Parque Natural Municipal de Sertão
ppt	Parte por Trilhão
RS	Rio Grande do Sul
SAL	Salinidade
SDs	Sólidos Dissolvidos
SPE	Extração em Fase Sólida
UC	Unidade de Conservação
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria

X²

Qui quadrado

µg L⁻¹

Micrograma por litro

LISTA DE SÍMBOLOS

- > Maior do que
- < Menor do que
- $\pm$ Desvio padrão para mais e para menos

SUMÁRIO

**INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA NA SAÚDE DE GIRINOS DE
APLASTODISCUS PERVIRIDIS (ANURA: HYLIDAE) ----- 11**

1 INTRODUÇÃO ----- 13

2 OBJETIVO -----16

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ----- 16

3 METODOLOGIA -----16

3.1 ÁREA DE ESTUDO -----16

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AMBIENTES E ÁREAS DO PNMS ----- 19

3.3 PARÂMETROS FÍSICO E QUÍMICO E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA. ----- 23

3.4 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NA ÁGUA ----- 24

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA -----26

4 RESULTADOS -----26

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA AGUA ----- 26

4.2 GIRINOS DE APLASTODISCUS PERVIRIDIS -----31

5 DISCUSSÃO ----- 34

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS -----37

REFERÊNCIAS -----38

**INFLUÊNCIA DO GRAU DE CONSERVAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO DE ANFÍBIOS
EM RIACHOS NO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO, SUL DO
BRASIL -----46**

1 INTRODUÇÃO -----48

2 METODOLOGIA -----50

2.1 ÁREA DE ESTUDO -----50

2.2 COLETA DE DADOS 54

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ----- 55

3 RESULTADOS ----- 55

4 DISCUSSÃO ----- 58

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS ----- 61

6 REFERÊNCIAS ----- 62

ANEXO I - PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO RÁPIDA (PAR), MODIFICADO A PARTIR
DO PAR PROPOSTO POR CALLISTO ET AL. (2002), UNINDO COM INFORMAÇÕES
DOS PROTOCOLOS DE MINATTI-FERREIRA; BEAUMORD (2006); RODRIGUES;
CASTRO (2008); RODRIGUES ET AL., (2012). 0 A 40 PONTOS, TRECHO
IMPACTADO; 41 A 60, TRECHO ALTERADO; ACIMA DE 61 PONTOS, TRECHO
NATURAL. -----68

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está intitulada como “Conservação de anfíbios de riachos do Parque Natural Municipal de Sertão, RS” elaborada e desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim. O PPGCTA faz parte da área 49 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ciências Ambientais (CiAmb), com foco em desenvolver e conectar conhecimentos de forma interdisciplinar. No PPGCTA o projeto está associado a área de concentração “Produção Sustentável e Conservação Ambiental” e a linha de pesquisa “Conservação do Recursos Naturais” vinculada ao Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Esta dissertação teve por objetivo identificar os impactos que as atividades antrópicas causam nos girinos de anfíbios e se o grau de conservação dos ambientes florestais influencia nas condições de sobrevivência dos anfíbios nos riachos em um fragmento e seu entorno. Este remanescente localizado em uma região de paisagem fragmentada no sul da Mata Atlântica é uma unidade de conservação municipal. Neste sentido, examinamos os danos genotóxicos e morfológicos causados por agrotóxicos e fertilizantes químicos a base de nitrogênio presentes na água e composição da comunidade de anfíbios distribuída nos diferentes ambientes no Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) e seu entorno. Os resultados obtidos poderão subsidiar ações de conservação, planejamento e gestão do Parque e dos remanescentes florestais da região.

O capítulo 1, intitulado “Influência da qualidade da água na saúde de girinos de *Aplastodiscus perviridis* (ANURA: HYLIDAE)” teve como objetivo o estudo foi avaliar como a qualidade da água afeta a saúde de girinos de *Aplastodiscus perviridis* em uma área de Mata Atlântica no sul do Brasil, através de parâmetros morfológicos e genotóxicos. O capítulo 2, intitulado “Influência do grau de conservação na distribuição de anfíbios em riachos no Parque Natural Municipal de Sertão, sul do Brasil”, teve como objetivo avaliar a distribuição da riqueza e a composição de espécies de anfíbios em riachos com diferentes graus de conservação em um remanescente florestal e seu entorno, no sul do bioma Mata Atlântica. Este capítulo será publicado no livro “Ciências biológicas: vida e organismos vivos”, na editora Atena.

INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA ÁGUA NA SAÚDE DE GIRINOS DE *APLASTODISCUS PERVIRIDIS* (ANURA: HYLIDAE)

RESUMO

A diversidade de vertebrados está em declínio em todo o mundo devido a múltiplas causas como por exemplo, fragmentação de habitats, infecções fúngicas e contaminantes químicos presentes na água. Este estudo analisa a influência de parâmetros físico químicos – incluindo agrotóxicos – e microbiológicos, na saúde de uma espécie de anfíbio em uma reserva de Mata Atlântica no sul Brasil. O estudo foi realizado no Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) no norte do Rio Grande do Sul e como biondicador foi utilizada a espécie *Aplastodiscus perviridis*, da qual 147 espécimes de girinos foram utilizados para analisar os danos morfológicos e genotóxicos. Nos ambientes do PNMS, foram encontrados setetipos diferentes de agrotóxicos, quantidades acima do permitido em rios de Classe I e II de nitrogênio amoniacal e diferenças dos parâmetros físico-químicos como, demanda bioquímica de oxigênio e oxigênio dissolvido acima do proposto pela classificação CONAMA 357, principalmente nos ambientes de borda e entorno. Resultados mostraram que existe diferença entre comprimento rostro cloacal e de massa dos girinos de *A. perviridis*, sendo maiores na borda e interior e menores no entorno, assim como as anormalidades nucleares de eritrócitos que foram maiores no entorno borda e menores no interior do PNMS. Essa diferença pode estar associada ao aumento da toxicidade dos agrotóxicos, o nitrogênio amoniacal e demanda bioquímica de oxigênio e oxigênio dissolvido o que indica que as populações de anfíbios estão sendo afetadas pela agricultura da matriz. Concluímos que o PNMS precisa de ações fiscalizações e controle associadas a utilização de agrotóxicos e fertilizantes a base de nitrogênio para manter as populações de *A. perviridis* saudáveis.

Palavras-chave: Anfíbios; Agrotóxicos; Genotóxico.

ABSTRACT

Vertebrate diversity is declining worldwide due to multiple causes such as habitat fragmentation, fungal infections and chemical contaminants in water. This study analyzes the influence of physical-chemical - including pesticides - and microbiological parameters on the health of an amphibian species in an Atlantic Forest reserve in southern Brazil. The study was carried out in the Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) in northern Rio Grande do Sul and the species *Aplastodiscus perviridis* was used as a bioindicator, of which 147 tadpole specimens were used to analyze morphological and genotoxic damage. In the environments of the PNMS, seven different types of pesticides were found, amounts of ammonia nitrogen above what is allowed in Class I and II rivers, and differences in physical-chemical parameters such as biochemical oxygen demand and dissolved oxygen above what is proposed by the CONAMA 357 classification, especially in the edge and surrounding environments. Results showed that there is a difference between cloacal rostrum length and mass of *A. perviridis* tadpoles, being larger in the border and interior and smaller in the surrounding area, as well as nuclear abnormalities of erythrocytes that were larger in the border environment and smaller inside the PNMS. This difference may be associated with increased pesticide toxicity, ammonia nitrogen and biochemical oxygen demand, and dissolved oxygen, indicating that amphibian populations are being affected by agriculture in the matrix. We conclude that the PNMS needs enforcement and control actions associated with the use of pesticides and nitrogen fertilizers to keep *A. perviridis* populations healthy.

Keywords: Amphibians; Pesticides; Genotoxic.

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade da Terra está ameaçada por fatores antrópicos, com taxas de perda de espécies sem precedentes (BARNOSKY, 2011; KNAPP, 2016, CEBALLOS, 2020). Os anfíbios são a classe que vem sofrendo maior declínio populacional e extinções: com estimativas de até um quinto das espécies estarem extintas ou à beira da extinção (CEBALLOS, 2020). Os declínios populacionais são causados por diversos fatores, principalmente ligados a fragmentação de habitats, mudanças climáticas (MILLER 2018), infecções fúngicas (O'HANLON, 2018) e contaminantes químicos (AGOSTINI *et al.*, 2020), especialmente na água.

A maior causa da fragmentação dos habitats é a expansão agrícola (GROOTEN & ALMOND, 2020). A atividade agrícola ocupa cerca de 40% da superfície terrestre da Terra e acarreta profundos impactos ambientais (FAO, 2022). Essa expansão aumenta a contaminação da água nos ambientes naturais e as bacias hidrográficas com maior influência da agricultura estão mais sujeitas a agentes tóxicos que podem causar danos à biota (FRANCO, 2018). Como resultado, os agrotóxicos vêm se espalhando e se acumulando no meio ambiente, representando um risco potencial para ecossistemas terrestres (TRAPP *et al.*, 2020) e aquáticos de água doce (MIRZAEI *et al.*, 2017; BONIFACIO & HUED, 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos e um dos quatro maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (DONLEY, 2019), com uma média de 17,7 L (soja), 7,4 L (milho) e 4,8 L (cana de açúcar) de agrotóxicos por hectare (PIGNATI, *et al.*, 2017). Dados de 2009 a 2020 mostram que os agrotóxicos mais vendidos no Brasil são Glifosato; 2,4-D; Mancozebe; Atrazina; Acefato; Clorotalonil; Malationa; Enxofre; Imidacloprido e Clorpirifós (IBAMA, 2020). Além disto, entre 2012 e 2022 foram incluídos 3255 novos registros de agrotóxicos comerciais no Brasil (MAPA, 2022). Devido ao intenso uso, os agrotóxicos ameaçam a qualidade dos ecossistemas (GONÇALVES, 2017), sendo um dos principais contaminantes de lagos e rios próximos a ambientes agrícolas.

A contaminação aquática faz com que a persistência e a saúde das populações de vertebrados, como anfíbios, sejam comprometidas (PELTZER *et al.*, 2017; ZHELEV *et al.*, 2017). Anfíbios são bioindicadores da qualidade do ambiente, pois absorvem água através de

uma região pélvica altamente vascularizada e altamente permeável que é fisiologicamente envolvida na troca de gás, água e eletrólitos com o meio ambiente (QUARANTA, 2009; MENDEZ, 2009; BRÜHL, 2011; BORGES, 2018).

A saúde dos anfíbios está fortemente ligada à saúde ambiental (ROY, 2002), e ambas podem ser afetadas por ações antrópicas. Já foram relatadas alterações no desenvolvimento, redução da capacidade reprodutiva e imunidade suprimida em anfíbios em ambientes alterados, tendo implicações diretas sobre a sobrevivência das populações deste grupo de animais (DEKNOCK, 2020). Portanto, acredita-se que a contaminação da água de ambientes lênticos e lóticos pode afetar principalmente estágios embrionários e larvais de anfíbios que se desenvolvem nestes locais, onde são mais suscetíveis a alterações antrópicas (FRYDAY & THOMPSON, 2017; BRODEUR, 2022).

A presença dos agrotóxicos nas águas superficiais indica uma qualidade ambiental reduzida, ocasionando efeitos ecotoxicológicos adversos (PELUSO, 2021). Os efeitos podem ser medidos por alterações externas morfológicas, malformações (AGOSTINI *et al.*, 2013) e por análises celulares, verificando a genotoxicidade na utilização de diferentes compostos (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; VANZETTO, 2019; AGOSTINI, 2020; RUTKOSKI, 2020a,b).

Os ensaios que envolvem análise de anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) é uma ferramenta para entender o efeito da contaminação agroquímica e o efeito genotóxico associado (JOSENDE, *et al.*, 2015). O ensaio ANE's detecta micronúcleos e outras estruturas nucleares anormais análogas, como núcleos entalhados e lobados, cuja formação também é induzida por compostos genotóxicos ou radiação (FENECH *et al.*, 2011).

Diversos estudos em laboratório têm se dedicado a responder quais os efeitos de agrotóxicos e outros contaminantes na saúde de anfíbios (PELTZER, 2017; RUTKOSKI, 2020a,b; PAVAN, 2021; TRAPP, 2021; BRODEUR, 2022), no entanto, existem poucas informações sobre girinos *in situ* (BABINI, 2018; PELUSO, 2021; ASCOLI-MORRETE *et al.*, 2022). Experimentos *in situ* reduzem o manuseio de amostras de água e permite uma exposição muito mais realista integrando a complexidade do ecossistema e prevendo os possíveis efeitos causados por diversos fatores em uma espécie (PELUSO, 2021).

Anfíbios que ocupam ambientes lóticos podem ser sensíveis as alterações no ambiente (WALLS *et al.*, 1992; WELSH & OLLIVIER, 1998; ASHTON, 2006), pois, mudanças em seu local de reprodução podem causar declínios nas populações (GERSON, 2012). Assim, são dependentes de vegetação ripária preservada com água preservada para desenvolvimento larval (LOURENÇO-DE-MORAES, 2018), porém pouco se sabe sobre quais os impactos da contaminação aquática sobre as espécies desse grupo que se desenvolvem em rios e riachos. Esses locais próximos a matriz agrícola podem conter diferentes agentes químicos (GOESSENS, 2022) e até mesmo, ambientes de interior de florestas podem estar sendo alterados (ROCHA *et al.*, 2020).

A região norte do Estado do Rio Grande do Sul constitui pequenos fragmentos isolados na matriz agrícola (MARTINAZZO, 2011) e um desses fragmentos é o Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS). A estrutura do PNMS possibilita ambientes diversos como riachos e charcos no interior, borda e entorno com diversidade de anfíbios (ZANELLA, 2013).

Aplastodiscus perviridis é uma espécie que utiliza riachos para reprodução, e o desenvolvimento dos girinos ocorre nesse ambiente (HADDAD *et al.*, 2005). Os ovos são colocados em cavernas subterrâneas nas margens de riachos e quando há inundação os girinos são liberados para a água do rio (HADDAD *et al.*, 2005).

Esta espécie possui uma ampla distribuição geográfica que inclui centro e sudeste do Brasil do sul de Goiás e Serra da Mantiqueira e faixas costeiras ao sul do Rio Grande do Sul e nordeste da Argentina; provavelmente para o Paraguai adjacente (FROST, 2021). *A. perviridis* é classificada como LC (menor preocupação) na lista de animais ameaçadas pela IUCN (IUCN, 2022).

Existem estudos sobre vocalização, filogenética (COLONNA, 2018) e dieta (OLIVEIRA, 2017) de *A. perviridis*, mas nenhum deles analisou efeitos da contaminação aquática e da fragmentação do habitat na saúde dessa espécie. Neste sentido, é necessária uma avaliação sobre os efeitos dos contaminantes químicos a nível genotóxico dos indivíduos de *A. perviridis*.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar como a qualidade da água afeta a saúde de girinos de *Aplastodiscus perviridis* em uma área de Mata Atlântica nos sul do Brasil, através de análises de parâmetros morfológicos e genotóxicos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- o Avaliar os parâmetros físico e químicos e microbiológicos dos riachos do Parque Natural Municipal de Sertão;
- o Avaliar a presença de agrotóxicos na água dos três ambientes do PNMS;
- o Analisar a frequência de anormalidades nucleares de eritrócitos e o impacto da conservação do ambiente e da qualidade da água a nível genotóxico nos indivíduos de *A. perviridis*;
- o Comparar os resultados morfológicos (CRC e massa) e correlacionar com os parâmetros físicos e químicos dos riachos dos diferentes ambientes do PNMS.

3 METODOLOGIA

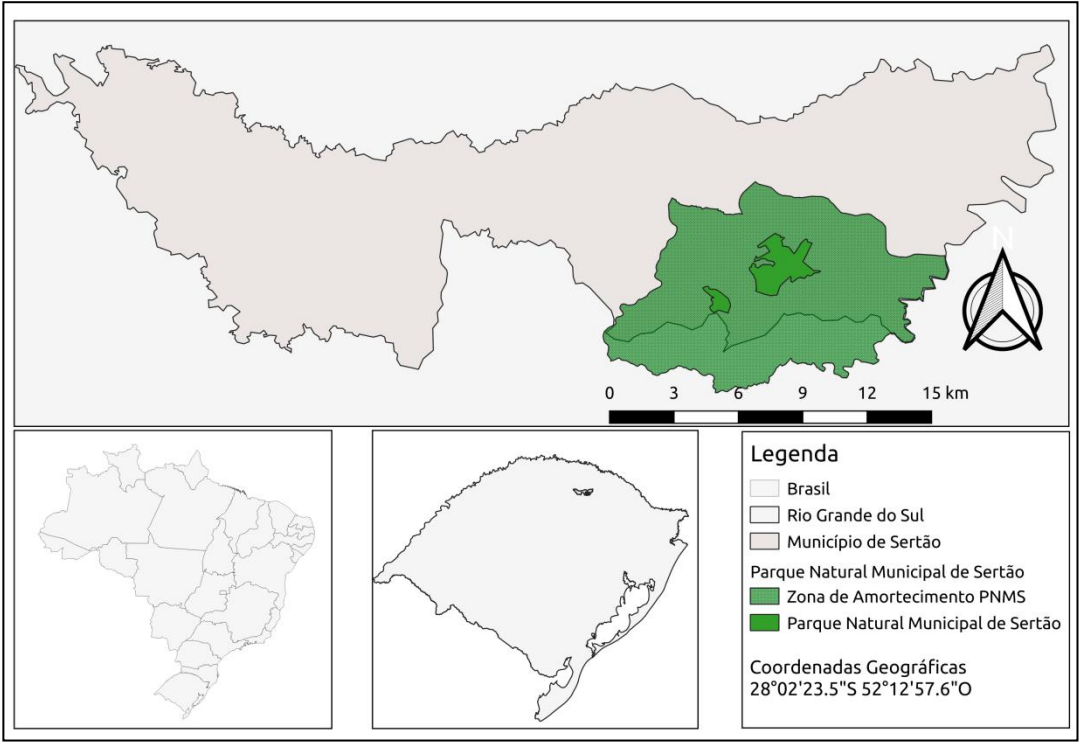
3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado Parque Natural do Municipal de Sertão (PNMS) (28°02'27.6"S, 52°12'58.1"W) e seu entorno, na região norte do Estado do Rio Grande do Sul (RS), município de Sertão. O PNMS é uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral com 590,80 ha (Figura 1) e representa a maior área de mata nativa e a segunda maior UC do norte do RS, perdendo em extensão apenas para a Flona de Passo Fundo, localizada no município de Mato Castelhano (TEDESCO & ZANELLA, 2014).

A área apresenta relevo levemente ondulado, com uma altitude aproximada de 650 m (PLANO DE MANEJO DO PARQUE, 2015). O clima apresenta temperatura média de 16,5°C, mínima de 4°C e máxima de 31°C com precipitação anual de 1.350 mm (EMBRAPA, 2021). A Vegetação conserva as características típicas da Floresta Ombrófila Mista, com diversas espécies compondo um dossel denso, de onde emergem as grandes araucárias (SLAVIERO, 2014).

O PNMS constitui em dois fragmentos florestais que totalizam 590,80 ha (TEDESCO & ZANELLA, 2014). O estudo foi realizado no maior fragmento, de 513 ha e nos remanescentes florestais no seu entorno sendo caracterizado por propriedades rurais de economia agrícola (Figura 2) com predomínio de plantações de soja, trigo, milho e aveia (PLANO DE MANEJO DO PARQUE, 2015).

Figura 1 – Localização do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS), município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, evidenciando a zona de amortecimento e a área total do PNMS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

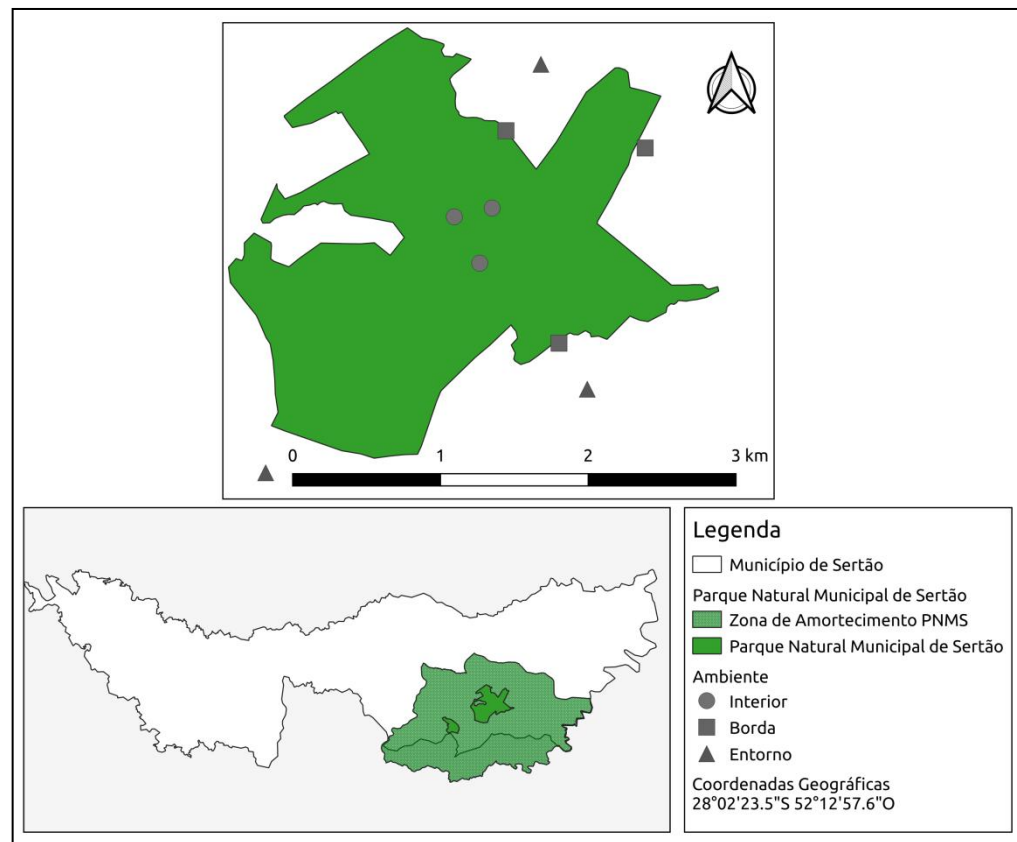
Figura 2 – Vista área do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS), município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, evidenciando a matriz agrícola no entorno do PNMS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Para realização do estudo, foram escolhidos três ambientes no PNMS: interior (I), borda (B) e entorno (E); (Figura 3). Em cada um desses ambientes foram escolhidos riachos onde ocorrem *Aplastodiscus perviridis* e definidas três áreas amostrais em cada ambiente, denominadas I1, I2 e I3 no interior, B1, B2 e B3 na borda e E1, E2 e E3 no entorno. Dessa maneira, foram analisados girinos e a água em riachos de nove áreas amostrais nos três ambientes do PNMS.

Figura 3 - Localização do Parque Natural Municipal de Sertão, município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, evidenciando as áreas amostrais do interior, borda e entorno.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AMBIENTES E ÁREAS DO PNMS

O ambiente do interior (Figura 4) caracteriza-se por ser o local onde ocorrem nascentes dentro da área de preservação do PNMS e observa-se que a vegetação adulta apresenta reflexos sutis da influência da borda (SLAVIERO, 2014). É o local que possui a maior proteção de vegetação ripária nos riachos, estendendo por mais de 15 metros de proteção, a partir da margem, e é também o local onde estão as árvores mais altas, as quais vão diminuindo em altura à medida que se aproxima da borda do fragmento florestal (SLAVIERO, 2014). A área amostral I1 é o riacho do interior que possui a menor largura $62,67 \pm 8,74$ cm e profundidade média de $9,57 \pm 0,58$ cm sendo o principal curso d'água do PNMS. A nascente deste encontra-se próximo a uma estrada pouco utilizada. A área amostral I2 encontra-se com o riacho da área amostral I1, é um riacho que possui sua nascente próximo ao local

onde será construída a sede do PNMS. Observa-se neste local a ausência de pequenos charcos, intensa vegetação cobrindo o riacho além de uma largura de riacho de $180,00 \pm 79,37$ cm e a menor profundidade entre a área interna com média de $4,00 \pm 1,00$ cm. O riacho da área amostral I3 é o mesmo riacho da área amostral I1 mas está a de 400 metros de distância (em linha reta) entre os locais de coleta e também é a foz do riacho da área amostral I2 com cerca de 200 metros entre os locais de coleta. Possui diversos tipos de ambientes aquáticos, pequenos poços e pequenas quedas d'água a vegetação é parecida com outros riachos do ambiente interno com presença de pequenos charcos próximos a margem e possui a largura de $180,00 \pm 36,06$ cm e profundidade de $8,67 \pm 3,61$ cm.

Figura 4 - Ambiente do interior do Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A composição e a abundância da vegetação do ambiente de borda demonstram ser influenciadas pelo gradiente de borda, apresentando uma separação parcial entre a matriz (SLAVIERO, 2014). O ambiente de borda (Figura 5) caracteriza-se por estar entre a matriz e o PNMS sendo que uma das margens está a menos de 15 metros da matriz e a outra dentro do

parque. O riacho da área amostral B1 nasce na área do entorno e percorre por toda a borda do PNMS, possui uma parte do riacho tubulado que forma uma ponte, presença de quedas d'água que formam poços e margens mais elevadas que o leito do riacho o qual possui largura de $175,33 \pm 23,76$ cm e profundidade de $8,67 \pm 4,73$ cm. A área amostral B2 possui um riacho que nasce dentro do PNMS, porém, não consideramos uma área interna pois a distância do riacho para a matriz é inferior a 15 metros, importante ressaltar que esse riacho possui barragem para captação de água para a pecuária da propriedade ao lado sendo assim é o riacho da área de borda com menor largura $151,33 \pm 24,44$ cm e com menor profundidade de $6,00 \pm 1,73$ cm. A área amostral B3 é o mesmo riacho da área amostral I1 e I3 porém, distantes 450 metros entre as áreas de coleta, é a única área de borda em que as duas margens estão dentro do PNMS possuindo mais que 15 metros de vegetação ripária em cada lado do riacho, é também o riacho da área de borda mais largo $201,67 \pm 27,54$ cm e o mais profundo $10,33 \pm 2,52$ cm.

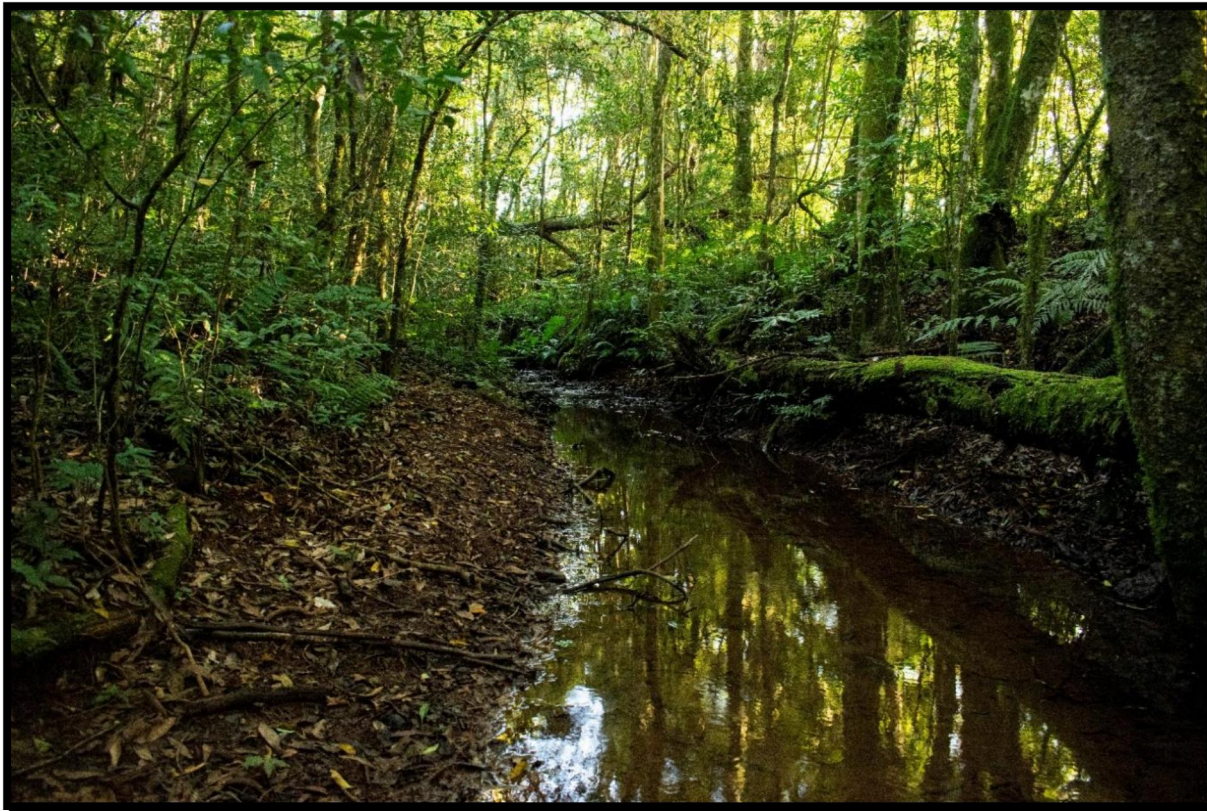
Figura 5 - Ambiente de borda do Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O ambiente do entorno (Figura 6) caracteriza-se por estar circundado pela a matriz, distante do PNMS sendo que as margens estão a menos de 10 metros da matriz. A composição vegetal sofre pelo efeito de borda por ambos os lados da margem e possui a menor vegetação ripária do PNMS. A área amostral E1 está cerca de 500 metros de distância do PNMS, o leito deste riacho é o mais arenoso, além de possuir pouca vegetação ripária, é importante ressaltar que ele tem sua nascente na matriz, sua largura é de $137,67 \pm 43,32$ cm e profundidade de $7,67 \pm 0,76$ cm. A área amostral E2 fica próxima à área de borda B1 e o riacho da área E2 tem a sua foz no riacho da área de borda B1, esse riacho tem a sua nascente e todo o seu trajeto na matriz, a vegetação ripária é menor que 10 metros em cada margem e a largura do riacho é de $184,33 \pm 22,14$ cm e profundidade de $10,67 \pm 1,15$ cm. A área amostral E3 possui o mesmo riacho da área amostral I1, I3 e B3 porém cerca de 600 metros de distância do local de coleta da área amostral B3, está localizado no meio da matriz agrícola, possui vegetação ripária menor que 10 metros em cada lado da margem e leito do riacho arenoso, a sua largura é de $175,67 \pm 22,05$ cm e profundidade de $9,33 \pm 4,04$ cm.

Figura 6 - Ambiente do entorno Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.3 PARÂMETROS FÍSICO E QUÍMICO E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA.

Foram realizadas duas amostragens da água distintas, a primeira foi realizada em campo e a segunda em laboratório. A amostragem em campo foi realizada com uma sonda multiparâmetros portátil YSI Professional Plus nos 9 pontos amostrais, em triplicata, respeitando uma distância de pelo menos 75 metros de cada local de aferição, onde foi mensurado o potencial hidrogeniônico (pH), a temperatura (T), o oxigênio dissolvido (OD), os sólidos totais dissolvidos (SDs) a salinidade (SAL) e a condutividade (CDT).

A segunda parte sobre a qualidade da água foram realizadas nos 9 pontos amostrais utilizando recipiente de 1 litro esterilizado em autoclave e duas amostras de 500 ml em garrafa PET lavada com água destilada e levadas para análise nos Laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul. Analisamos cinco parâmetros que identificam a presença de compostos físico-químicos e microbiológicos: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio e fósforo. Esses valores foram comparados com a resolução 357 do CONAMA (BRASIL, 2005)

Para a determinação do nitrogênio amoniacal foi realizada uma titulação; a amostra é tamponada a pH 9,5 para evitar a hidrólise de tiocianatos e outros compostos orgânicos, após é destilada e coletada em uma solução absorvente de ácido Bórico; e então titulado com um titulante de ácido sulfúrico, este método é indicado para 5 a 100 mg N-NH₃/L (AOAC, 2000).

O fósforo (FF) foi determinado a partir do método fósforo solúvel, um método colorimétrico que necessita de ácido sulfúrico, antimônio-tartarato de potássio, molibdato de amônia e ácido ascórbico, para na presença de fósforo, obter uma solução de coloração intensa. Esta solução é encaminhada para leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 880 nm, e comparada com uma curva padrão (APHA; AWWA; WEF, 2012; AOAC, 2000).

Para analisar a DBO utilizou-se o teste de DBO_{5,20}, que apresenta o consumo de 80% da matéria orgânica presente. O teste consiste em armazenar a amostra em um local sem luz por 5 dias a 20°C. Para definir este valor é necessário realizar a verificação do oxigênio dissolvido antes e depois deste período (APHA; AWWA; WEF, 2012; AOAC, 2000).

Para a determinação dos coliformes termotolerantes foi realizado o método de ensaio em tubos múltiplos, os resultados são expressos em N.M.P (Número Mais Provável) / 100 ml (APHA; AWWA; WEF, 2012; AOAC, 2000).

3.4 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NA ÁGUA

Para mensurar a concentração de resíduos de agrotóxicos em cada área amostral, foi coletada uma amostra de água com recipientes de vidro limpos com água destilada, e armazenados em geladeira a 0°C e encaminhados para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) no departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Para análise dos agrotóxicos na água, foi utilizado o método de determinação de resíduos de pesticidas empregando extração em fase sólida (SPE) e LC-MS/MS a qual abrange em seus testes os compostos da tabela 1 com limite de detecção do método (LOD) e limite de quantificação do método (LOQ) este quando menor (<LOQ) o composto está presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método.

Tabela 1 – Agrotóxicos presentes na água com o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método da análise.

AGROTÓXICOS	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
Ametrina, atrazina, azoxistrobina, clomazona, cresoxim-metílico, difenoconazol, epoxiconazol, fenamidona, fironil, fluazifope-P-butílico, flutolanil, imazaquim, imazetapir, linurom, metalaxil, metconazol, monolinuron, penoxsalam, piraclostrobina, pirimifós-metílico, profenofós, propanil, propiconazol, propoxur, quizalope-p-etílico, saflufenacil, simazina, tetraconazol, tolclofós-metílico, triciclazol e trifloxistro	0,006	0,02

2.4-D, carbaril, carbofurano-3-hidróxido, clorpirifós-etílico, cianazina, dimetoato, diurom, fentiona, imazamoxi, imazapique, imidacloprido, metsulfurom-metílico, quincloraque, tiobencarbe	0,012	0,04
Bentazona, carbendazim, clorimurom-etílico, cialofope-b-butílico, imazapir, molinato, tebuconazol, tiabendazol, tiametoxam	0,024	0,08

Fonte: Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

3.5 GIRINOS DE *APLASTODISCUS PERVIRIDIS*

Os girinos de *A. perviridis* foram coletados de fevereiro a março de 2021, no período noturno nas nove áreas, utilizando o método de procura ativa. Para a coleta, foi utilizado um balde revestido por uma sacola plástica rígida, já numerada e com a água do local de coleta, uma peneira grande de 50 cm de diâmetro e uma colher de sopa para auxiliar a captura em locais onde eles se escondiam abaixo de pedras, galhos, vegetação e raízes. Após as coletas, os girinos foram colocados em caixa térmica e levados para o laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim, para análise.

Em laboratório foi realizada a confirmação da espécie, utilizando as características descritas por Caramaschi (1980). Depois, foram selecionados apenas os girinos no estágio 25, ao qual o aparato bucal e de locomoção aquática está totalmente desenvolvido, que foram avaliados quanto à existência ou não de malformações, por observação visual em estereomicroscópio, verificando olho, narina, aparato bucal, curvatura da coluna, padrão da cauda, intestino e formato do corpo.

O tamanho do corpo de todos os girinos coletados em estágio 25 foi medido pelo comprimento rostro-cloacal (CRC) utilizando paquímetro Universal Analógico Mitutoyo 530-140BR de 150 mm com precisão de 0,05 mm. A massa foi medida por balança digital de precisão SHIMADZU modelo UX620H (0,001 g), considerando o peso úmido do animal.

Para análise de anormalidades nucleares nos eritrócitos, 32 girinos no ambiente interno, 31 girinos no ambiente de borda e 33 girinos no ambiente do entorno foram retirados aleatoriamente das amostras e eutanasiados utilizando lidocaína 2% (de acordo com as normas do CONCEA, 2018). Foi retirada uma gota de sangue por punção cardíaca de cada girino e feitos esfregaços em lâminas, que foram fixadas durante 24 horas a temperatura ambiente e em seguida coradas com corante Kit panótico rápido para hematologia da marca Laborclin sobre registro da ANVISA 10097010105.

A presença de anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE`s) foi determinada através da análise de 1.000 eritrócitos (FENECH, 2000) de cada girino. Foi determinada a frequência das seguintes anormalidades nucleares: (1) Células Anucleadas; (2) Células com Apoptose; (3) Células Binucleadas; (4) Célula com Broto Nuclear; (5) Células lobadas e (6) Células entalhadas (7) Micronúcleo (CARRASCO, TILBURY e MYRES (1990) e FENECH *et al.* (2011)).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados foi testada pelo teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. No caso de dados de distribuição normal e homogeneidade das variâncias, foi realizado o teste de ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey. Outros dados foram transformados usando distribuição linear para serem analisados por ANOVA. Todas as análises foram feitas no RStudio Team (2020). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como referência para significância estatística. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA

Dos nove parâmetros da qualidade da água analisados, quatro apresentaram valores elevados diferentes em comparação com a resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005). Nos resultados das aferições *in loco*, as áreas do interior do PNMS apresentaram os menores valores de temperatura (°C) da água, oxigênio dissolvido e PH (Tabela 2). A temperatura no interior foi significativamente diferente do ambiente de borda ($F_{(2, 23)} = 4,49$, $p < 0,024$). O oxigênio dissolvido (domg/L) v a água do interior teve menor oxigênio do que o ambiente de borda e entorno ($F_{(2, 23)} = 19,95$, $p = 0,001$). A condutividade e a salinidade foram semelhantes nos três ambientes, e o pH no interior foi diferente da borda e do entorno ($F_{(2, 23)} = 22,41$ $p < 0,001$).

Já para as aferições da água em laboratório, as áreas do interior do PNMS apresentaram os resultados do nitrogênio total e demanda bioquímica de oxigênio menores em mg/L em relação a borda e ao entorno respectivamente. O fósforo total também obteve resultados em mg/L maiores no entorno e borda do que no interior.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos da água da análise em campo: temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade e pH (média ± desvio padrão, mínimo e máximo) nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. (* riachos de classe II; ** riachos de classe III e *** riachos de classe IV segundo a classificação do CONAMA 357)

Análise in loco					
Ambiente	Temperatura C	Oxigênio dissolvido domg/L	Condutividade c-US	Salinidade SAL	Ph
INTERIOR	18,41 ± 0,55	2,07 ± 0,18 ***	46,32 ± 3,91	0,02 ± 0.00	7,52 ± 0,02
	17,70 -	1,80 - 2,30	43,10 - 53,10	0,02 -	7,49 - 7,55
	19,20			0,03	
BORDA	19,34 ± 0,80	2,63 ± 0,38 ***	64,48 ± 28,52	0,03 ± 0.01	7,57 ± 0,02
	18,30 -	2,20 - 3,30	40,70 -	0,02 -	7,55 - 7,59
	20,50		103,90	0,06	
ENTORNO	18,96 ± 0,54	2,87 ± 0,51 ***	72,41 ± 19,84	0,04 ± 0.01	7,57 ± 0,01
	18,40 -	2,60 - 4,20	40,70 - 95,70	0,02 -	7,56 - 7,58
	19,80			0,05	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos da água: a análise em laboratório: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total e fósforo total (média ± desvio padrão, amplitude) nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.(* riachos de classe II; ** riachos de classe III e *** riachos de classe IV segundo a classificação do CONAMA 357)

Análise em laboratório			
Ambiente	DBO	Nitrogênio Total	Fósforo Total
	mg/L	mg/L	mg/L
INTERIOR	1,29 ± 0,27	0,35 ± 0,25	0,001 ± 0,00
	0,89 – 1,58	0,00 – 0,72	0,00 – 0,01
BORDA	1,73 ± 1,1*	3,49 ± 2,32**	0,04 ± 0,00*
	0,04 – 3,53	0,00 – 5,48	0,03 – 0,04
ENTORNO	1,7 ± 1,11*	2,39 ± 2,93**	0,02 ± 0,01*
	0,04 – 3,36	0,00 – 6,78	0,01 – 0,04

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A análise de agrotóxicos (Tabela 3) detectou agrotóxicos em todas as áreas amostrais. O mais encontrado foi o herbicida Imazetapir identificado em todos os ambientes, seguido pelo ácido diclorofenoxiacético (2,4 - D). Ao todo foram registrados 10 diferentes tipos de agrotóxicos: 05 herbicidas, 03 inseticidas e 02 fungicidas. No interior foram registrados 04 agrotóxicos, na borda 05 e no entorno 07. No interior, duas áreas amostrais apresentaram somente Imazetapir, em uma concentração entre 0,059 e 0,145 µg L⁻¹. A outra área (I3), teve 04 agrotóxicos detectados. Na borda, mais agrotóxicos foram detectados, principalmente em duas áreas (B2 e B3 com 03 e 05 registros respectivamente) e Imazetapir chegou à concentração de 0,415 µg L⁻¹. O entorno foi o local com maior número de detecções, pois E1 teve 07 diferentes tipos de agrotóxicos e a maior concentração de 2,4-D, com 0,043 µg L⁻¹. Alguns agrotóxicos aparecem somente no entorno (E1), como é o caso de Atrazina, Difenconazol, Fipronil e Trifloxistrobina.

Tabela 4 – Agrotóxicos detectados por ambiente e área amostral no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$, de acordo com o limite de quantificação do método (LOQ). (<LOQ) indica que o composto está presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método.

AMBIENTE	ÁREA	AGROTÓXICO		CONCENTRAÇÃO
				O (µg L ⁻¹)
INTERIOR	I1	Imazetapir	Herbicida	0,059
	I2	Imazetapir	Herbicida	0,145
	I3	2,4 - D	Herbicida	0,035
		Clomazone	Herbicida	< LOQ
		Diurom	Herbicida	< LOQ
		Imazetapir	Herbicida	0,062
BORDA	B1	Imazetapir	Herbicida	0,296
	B2	2,4 - D	Herbicida	0,034
		Etoprofós	Inseticida	< LOQ
		Imazetapir	Herbicida	0,415
	B3	2,4 - D	Herbicida	0,042
		Diurom	Herbicida	< LOQ
		Etoprofós	Inseticida	< LOQ
		Profenofós	Inseticida	< LOQ
		Imazetapir	Herbicida	0,079
ENTORNO	E1	2,4 - D	Herbicida	0,038
		Atrazina	Herbicida	< LOQ
		Difenoconazol	Fungicida	< LOQ
		Etoprofós	Inseticida	< LOQ
		Fipronil	Inseticida	< LOQ
		Imazetapir	Herbicida	0,144
		Trifloxistrobina	Fungicida	< LOQ
	E2	2,4 - D	Herbicida	0,043
		Etoprofós	Inseticida	< LOQ
		Imazetapir	Herbicida	0,129
	E3	Imazetapir	Herbicida	0,077

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.2 GIRINOS DE APLASTODISCUS PERVIRIDIS

Foram coletados no total 147 girinos de *A. perviridis* nos três ambientes do PNMS. Na análise morfológica nenhum apresentou malformação nos parâmetros estabelecidos. Alguns indivíduos apresentaram terminações caudais que assemelhavam com cortes naturais, assim não foram caracterizados como malformações.

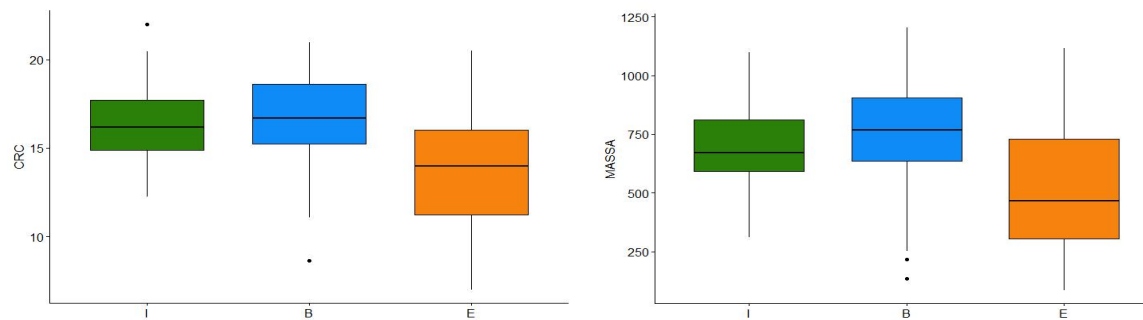
O CRC (Tabela 04), os menores girinos foram os da área de entorno, que foram diferentes dos girinos da área de borda e do interior ($F_{(2, 144)}= 12,85, p <0,001$) (Figura 07). Em relação a massa, os girinos de *A. perviridis* (Tabela 04), a dos girinos do entorno foram menor do que a dos girinos do interior e da borda ($F_{(2, 144)}= 12,05 p <0,001$; Figura 07).

Tabela 5 – Número de indivíduos coletados (N), Comprimento Rostro Cloacal (CRC) e massa com média, desvio padrão, amplitude de girinos de *Aplastodiscus perviridis*, nos diferentes ambientes do Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.

AMBIENTE	N	CRC (mm)	MASSA (g)
INTERIOR	39	16,27 ± 2,16	693,69 ± 171,18
		12,26 - 22,01	310,00 - 1098,00
BORDA	32	16,54 ± 2,80	739,78 ± 260,95
		8,64 - 20,95	135,00 - 1205,00
ENTORNO	72	13,96 ± 3,25	517,75 ± 270,42
		6,98 - 20,50	86,00 - 1117,00

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 7 – Comprimento rostro cloacal (CRC) e massa de girinos de *Aplastodiscus perviridis* nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal De Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. I – Interior, B – Borda e E – Entorno. Linha horizontal = median; caixa = quartis; linha vertical = amplitude dos dados



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Foram analisados os eritrócitos de 31 girinos no ambiente do interior, 29 girinos no ambiente de borda e 30 girinos no ambiente do entorno resultando em 90 indivíduos, totalizando 90000 células (Tabela 5). Todas as sete ANE's foram encontradas nos eritrócitos dos girinos de *A. perviridis* dos três ambientes estudados no PNMS. O micronúcleo foi menos registrado nos girinos do interior ($F_{(2, 87)} = 5,866$, $p < 0,004$), em relação aos girinos do ambiente de borda e do entorno. A frequência de ANE's (total, somando micronúcleo) foi significativamente menor em girinos encontrados no ambiente do interior em relação aos girinos do ambiente de borda e do entorno ($F_{(2, 87)} = 76,11$ $p < 0,0001$). O número de ANE's dos girinos do ambiente do interior foi menor do que da borda e do entorno e menor dos girinos da borda em relação aos girinos do entorno.

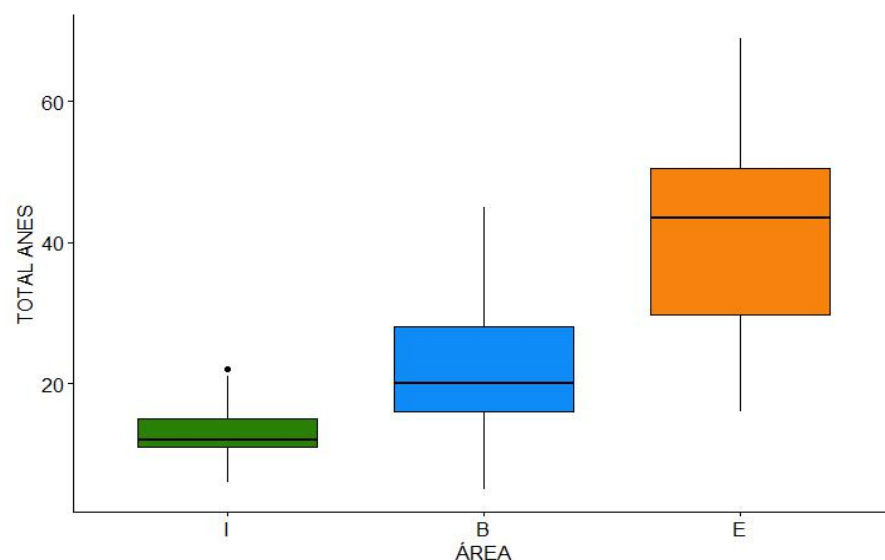
As ANE's mais frequentes foram células lobadas (3,22%) e células entalhada (1,92%), sendo que nos girinos do interior, células broto e células lobados, foram mais registrados, as ANE's da borda foram as células lobada e células entalhada e do entorno células lobada e células entalhada. O interior apresentou uma frequência total de 1,30% enquanto a borda 2,19% e o entorno 4,14%.

Tabela 6 – Frequência (por 1000 células) das anormalidades nucleares (ANE’s) registradas em eritrócitos de girinos de *Aplastodiscus perviridis*, Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. Número ± desvio padrão, valores máximos e mínimos.

AMBIENTE	N	FREQUÊNCIA	BINUCLEADA	ANUCLEADA	ENTALHADA	BROTADO	LOBADO	APOPTOSE	MN
INTERIOR	31	1,30%	0,19 ± 0,40	0,48 ± 0,56	2,87 ± 2,28	3,77 ± 1,93	4,03 ± 2,15	0,55 ± 0,93	1,06 ± 1,09
			0,00 - 1,00	0,00 - 4,00	0,00 - 15,00	0,00 - 8,00	1,00 - 9,00	0,00 - 4,00	0,00 - 3,00
			0,02%	0,05%	0,29%	0,38%	0,40%	0,05%	0,11%
BORDA	29	2,19%	0,83 ± 1,26	0,48 ± 0,63	4,83 ± 3,97	2,86 ± 4,22	10,00 ± 2,90	0,86 ± 1,53	2,03 ± 1,55
			0,00 - 4,00	0,00 - 2,00	0,00 - 11,00	0,00 - 20,00	5,00 - 17,00	0,00 - 6,00	0,00 - 7,00
			0,08%	0,05%	0,48%	0,29%	1,00%	0,09%	0,20%
ENTORNO	30	4,14%	1,17 ± 1,50	0,33 ± 1,46	11,47 ± 8,37	5,60 ± 4,03	18,20 ± 4,22	2,10 ± 2,12	2,53 ± 2,45
			0,00 - 6,00	0,00 - 7,00	12,00 - 27,00	1,00 - 13,00	5,00 - 27,00	0,00 - 6,00	1,00 - 10,00
			0,12%	0,03%	1,15%	0,56%	1,82%	0,21%	0,25%

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 8 – ANE's registradas em eritrócitos de girinos de *Aplastodiscus perviridis* nos três ambientes amostrados no Parque Natural Municipal de Sertão, norte do Estado do Rio Grande Do Sul. I – Interior, B – Borda e E – Entorno. Linha horizontal = median; caixa = quartis; linha vertical = amplitude dos dados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5 DISCUSSÃO

Estudos realizados com anfíbios *in situ* tem demonstrado a grande sensibilidade desses organismos a perturbações ambientais (PELUSO, 2021; BRODEUR, 2022; GOESSENS, 2022). Neste estudo demonstramos que os parâmetros da água analisados foram diferentes nos ambientes do interior, borda e entorno do PNMS e que girinos de *A. perviridis* que vivem nessa água apresentaram tamanhos distintos, e evidências de danos a nível celular em células do sangue. *A. perviridis* tem toda a primeira fase de desenvolvimento embrionário e larval na água (HADDAD *et al.*, 2005), estando sujeito a qualquer tipo de contaminação ou interferências na estrutura do ambiente.

O parâmetro da água que chama atenção é o oxigênio dissolvido (OD) que não poderia ser inferior a 6 mg L⁻¹ em rios classe I, 5 mg L⁻¹ em rios classe II, 4 mg L⁻¹ em rios Classe III e teriam que ser superior a 2 mg L⁻¹ em rios classe IV. Somente na área de entorno o OD chegou a 4 mg L⁻¹ (nos outros foi menor), o que é um indicativo de contaminação e de que os rios do PNMS sejam classe III ou IV (BRASIL, 2005). Enquanto o parâmetro físico químico

da água DBO e apresentou a sequência, do maior para o menor: borda > entorno > interior. DBO tem relação com matéria orgânica disponível e é considerado como um indicador concreto de poluição orgânica (FURTADO *et al.*, 2022) o que indica que as águas da borda e entorno sejam classificadas como classe II pois ficaram entre 3 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹. O pH não mostrou muita diferença entre os riachos, mas também foi maior no interior.

O fósforo pode ser de origem natural, por lixiviação de rochas, ou pode ser de origem antrópica proveniente de agrotóxicos, fertilizantes e de dejetos de animais (LIBÂNIO, 2016). A Resolução CONAMA 357 prevê que a concentração máxima de fósforo total, em ambientes lóticos para que seja classificado como classe 1 deve ser de até 0,1 mg L⁻¹ (LIBÂNIO, 2016, BRASIL, 2005) e as águas da borda e do entorno do PNMS apresentaram entre 0,01 mgL⁻¹ e 0,04 mg L⁻¹ o que as classificam como águas de classe II.

Dos resultados obtidos, o nitrogênio chama a atenção nos pontos de coleta da borda e do entorno. Sabemos que a exposição ao nitrito pode resultar em alterações dos parâmetros morfológicos, histológico, inibição do desenvolvimento esquelético e a nível de expressão de genes (WANG, 2022). Também há estudos onde a exposição a 10 mg L⁻¹ de amônia durante o estágio larval de anfíbios tem efeitos negativos na resposta inflamatória o que poderia implicar na suscetibilidade a patógenos e parasitas (ZAMORA-CAMACHO, 2022). De acordo com a CONAMA 357 (BRASIL, 2005), o nitrogênio não poderia ser superior a 3,7 mg L⁻¹ em rios Classe I, o que ocorreu na borda e no entorno, indicando que os riachos analisados podem ser classificados como Classe II e Classe III.

Os agrotóxicos encontrados na água dos riachos do PNMS e entorno mostram o quanto a agricultura pode contaminar Unidades de Conservação. O registro de resíduos em todos os ambientes e a detecção de 10 diferentes tipos de agrotóxicos na água levam a pensar com cuidado sobre a condição do ambiente para os organismos, e no caso deste estudo, para anfíbios. Os herbicidas foram os mais encontrados, principalmente Imazatapir e 2,4 D, muito utilizados na cultura da soja (ANVISA, 2022), comum na região. O entorno do PNMS, por ser o local com contato mais direto com plantações agrícolas, apresentou maior número de detecções, indicando que os girinos de *A. perviridis* podem estar se desenvolvendo em uma mistura de até sete tipos de agrotóxicos.

Os girinos foram encontrados principalmente nos ambientes na proximidade de charcos ou remansos parados do rio, próximos aos locais o qual os adultos de *A. perviridis*

foram encontrados em atividade de vocalização (obs. pess.). Neste contexto, os locais de maior encontro de girinos foram no entorno. Na área B2 não foram encontrados girinos nas buscas, e uma explicação pode ser a concentração de Imazetapir na água, pois foi nessa área que o herbicida estava mais concentrado. Não existe limites para concentração de Imazetapir nas águas brasileiras (BRASIL, 2021), e embora estudos sobre toxicologia em anfíbios tenham sido feito com concentrações bem mais altas do que as encontradas no PNMS, esse herbicida pode causar vários efeitos negativos em girinos, incluindo genotoxicidade (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2021)

Os girinos de *A. perviridis* apresentaram maior tamanho (medido pelo comprimento rostro-cloacal e massa) nos riachos de borda e menores nos riachos do entorno. Na borda e entorno, a explicação para maiores tamanhos pode ser a contaminação da água por matéria orgânica, evidenciada nos parâmetros físicos químicos analisados. No entorno, também é possível que essa diferença possa estar relacionada com a maior presença de agrotóxicos. Embora o tamanho corporal seja uma característica altamente variável, esta análise geralmente é correlacionada entre os estágios de vida dos girinos e indivíduos adultos (PHUNG *et al.*, 2020). Como todos os girinos medidos e pesados estavam dentro do mesmo estágio de desenvolvimento, os dados realmente mostram uma diferença no tamanho dos girinos entre os ambientes. Esse tamanho corporal reduzido pode resultar em adultos menores e, conseqüentemente, com menor taxa de sobrevivência e reprodução (BEASLEY, 2019).

As anormalidades nucleares de eritrócitos apresentaram significancia entre interior, borda e entorno, sendo que o entorno apresentou a maior quantidade de ANE's. A presença significativa causam danos biológicos como: tumores, alterações em órgãos e diminuição da aptidão da espécie (PELUSO et. al., 2020). Os eritrócitos dos girinos analisados mostra que a saúde dos girinos de *A. perviridis* que se desenvolvem no PNMS e entorno não está em ótimas condições – especialmente nos que se desenvolvem no entorno. A água onde esses girinos vivem contém diversos tipos de agrotóxicos e a amônia que está em concentração maior que o permitido em rios de Classe I. Esses fatores podem ser determinantes para a sobrevivência dos girinos, uma vez que o nitrogênio aumenta os níveis de toxidade dos agrotóxicos (HEGDE et al., 2019).

Em ambientes lóticos são encontradas quantidades menores de agrotóxicos do que em ambientes lênticos (ou seja, concentrações máximas de 0,029 versus 2,72 $\mu\text{g L}^{-1}$) (TEKLU *et*

al., 2016). Poucos estudos crônicos e de campo foram efetuados com anfíbios tropicais para demonstrar a cadeia de efeitos dos níveis sub letais de nitrogênio sob condições ambientais realistas (DAAM *et al.*, 2019; MOONEY *et al.*, 2019), porém, esses estudos fornecem explicações para a diferença das anormalidades encontradas no sangue dos indivíduos de *A. perviridis*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ambientes do PNMS possuem diferenças nos parâmetros físicos químicos e microbiológicos da água e presença de sete diferentes tipos de agrotóxicos. Os girinos do PNMS são menores no entorno e apresentam maior frequência de ANE's, devido a essas diferenças na qualidade da água, o que faz sentido pois girinos são incapazes de escapar do ambiente contaminado, e estão presos nele até a metamorfose, processo ao qual o indivíduo passa por diversas atividades celulares.

Uma das formas de diminuir os resíduos de agrotóxicos na água, é implantar estratégias de proteção ambiental, manutenção de áreas de reserva legal e preservação permanente próximo aos corpos hídricos (LUCAS *et al.* 2020) – o que tem que ser melhorado no PNMS.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, M. G.; KACOLIRIS, F.; DEMETRIO, P.; NATALE, G.; BONETTO, C.; RONCO, AE. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in Northeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Diseases of aquatic organisms**. v. 104, p. 163-171. 2013. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02592>.

AGOSTINI, M. G.; ROESLER, I.; BONETTO, C.; RONCO, A. E.; BILENCA, D. Pesticides in the real world: the consequences of gmo-based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108355, 2020.

ALMOND, R.E.A.; GROOTEN, M.; PETERSON, T., EDS. Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss. **Gland, Switzerland: World Wildlife Fund**. ISBN 978-2-940529-99-5. 2020.

ANVISA. Agência de vigilância Sanitaria. Índice monográfico. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4285json-file-1>. Último acesso 10 de mar 2022.

AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. 17th ed., **AOAC International, Arlington**, 2000.

APHA; AWWA; WEF, Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 22 ed. **American Public Health Association, American Water Works Association**, Water Environment Federation. Washington, DC. 2012.

ASCOLI-MORRETE, T.; BANDEIRA, N. M. G.; SIGNOR, E.; GAZOLA, H. A.; HOMRICH, I. S.; BIONDO, R.; ROSSATO-GRANDO, L. G.; ZANELLA, N. Bioaccumulation of pesticides and genotoxicity in anurans from southern Brazil. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 29, n. 30, p. 45549-45559, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-022-19042-z>.

ASHTON, D. T.; MARKS, S. B.; WELSH, H. H. Evidence of continued effects from timber harvesting on lotic amphibians in redwood forests of northwestern California. **Forest Ecology And Management**, v. 221, n. 1-3, p. 183-193, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2005.09.015>.

BABINI, M.; BIONDA, CL.; SALINAS, Z.; SALAS, N.; LUDOVICO, A. Reproductive endpoints of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae): Populations that persist in agroecosystems and their use for the environmental health assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 154, 2018. 10.1016/j.ecoenv.2018.02.050.

BARNOSKY, A. D.; MATZKE, N.; TOMIYA, S.; WOGAN, G. O. U.; SWARTZ, B.; QUENTAL, T. B.; MARSHALL, C.; MCGUIRE, J. L.; LINDSEY, E. L.; MAGUIRE, K. C.. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51-57, 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09678>.

BEASLEY, V. R. Direct and Indirect Effects of Environmental Contaminants on Amphibians. **Reference Module In Earth Systems And Environmental Sciences**, p. 1-25, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11274-6>.

BONIFACIO, A. F.; HUED, A. C.. Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Chemosphere**, v. 236, p. 124311, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042>.

BORGES, R. E.; SANTOS, L. R. DE S.; ASSIS, R. A.; BENVINDO-SOUZA, M.; FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. DE. Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 26, n. 3, p. 2623-2634, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-3779-z>.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº357**, de 15 de junho de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Último acesso em 10 de mar 2022.

BRODEUR, J. C.; DAMONTE, M, J.; ROJAS, D, E.; CRISTOS, D.; VARGAS, C.; POLISERPI, M, B.; ANDRIULO, A, E. Concentration of current-use pesticides in frogs from the Pampa region and correlation of a mixture toxicity index with biological effects. **Environmental Research**, v. 204, p. 112354, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2021.112354>.

BRÜHL, CA, PIEPER, S. E WEBER, B. Amphibians at risk? Suscetibilidade de fases da vida dos anfíbios terrestres a pesticidas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 2465-2472, 2011. <https://doi-org.ez372.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.650>.

CARAMASCHI, U.; JIM, J.; C. M. CARVALHO, C. M. Observações sobre *Aplastodiscus perviridis* A. Lutz (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 40(2): 405-408. 1980.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in siter biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2436, 1990

CEBALLOS, G.; EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 117, n. 24, p. 13596-13602, 2020. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1922686117>.

COLONNA, J. G.; NAKAMURA, E. F.; ROSSO, O. A. Feature evaluation for unsupervised bioacoustic signal segmentation of anuran calls. **Expert Systems With Applications**, v. 106, p. 107-120, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eswa.2018.03.062>.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Concea Normativa No 21**, de 20 de Março de 2015. Brasília, 2015.

DAAM, M. A.; MOUTINHO, M. F.; ESPINDOLA, E. L. G.; SCHIESARI, L. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. **Ecotoxicology**, v. 28, p. 707–715, 2019.

DEKNOCK, A.; GOETHALS, P.; CROUBELS, S.; LENS, L.; MARTEL, A.; PASMANS, F. Towards a food web based control strategy to mitigate an amphibian panzootic in agricultural landscapes. **Global Ecology And Conservation**, v. 24, p. 01314, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01314>.

DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 18-44, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12940-019-0488-0>.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa trigo – setor de meteorologia**. Passo Fundo, RS. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/app/principal/graficos.php>. Último acesso em 24 Fev 2022.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, **Agri-environmental Indicators Pesticides**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/dataEP>. Último acesso em janeiro de 2022.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, 455. 81-95. 2000.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FRANCO, R. M.; SANCHES, P. V. Avaliação da contaminação da água em rios com influência agrícola no sudoeste do Paraná. 2018. 70 f. Tese (Doutorado) - **Curso de Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca**, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018. Cap. 1.

FROST, D.R.. University of California, Berkeley, CA, USA. Disponível em: <http://amphibiaweb.org>. Último acesso em 10 jan 2022.

FRYDAY, S.; THOMPSON, H. 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**, v. 9, n. 9, p. 1-348, 2012. <http://dx.doi.org/10.2903/sp.efsa.2012.EN-343>.

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual prático de análise de água**. 4 ed. 2013. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/site/wpcontent/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf. Último acesso em: 14 jun. 2020

FURTADO, R. R.; PEREIRA, M. C. S.; SUCCI, M. M. D.; MARTINS, J. R. S. Análise da demanda bioquímica de oxigênio no rio pinheiros entre 2009 e 2019 e atendimento aos parâmetros de qualidade água do projeto novo rio pinheiros. *in*. XIV ENAU - ENCONTRO NACIONAL DE ÁGUAS URBANAS E IV SRRU - SIMPÓSIO DE REVITALIZAÇÃO DE RIOS URBANOS, 2022, Brasília – DF, **Anais eletrônico**: [...] Brasília: Associação

Brasileira de Recursos Hídricos, 2022. Disponível em: https://files.abrhidro.org.br/Eventos/Trabalhos/189/XIV-ENAU_IV-SRRU0045-1-0-20220818-185815.pdf.

GERSON, H. International trade in amphibians: A customs perspective. **Alytes**. 29. 103-115. 2012.

GOESSENS, T.; BAERE, S. de; DEKNOCK, A.; TROYER, N. de; VAN LEEUWENBERG, R.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; GOETHALS, P.; LENS, L.; SPANOGHE, P.. Agricultural contaminants in amphibian breeding ponds: occurrence, risk and correlation with agricultural land use. **Science Of The Total Environment**, v. 806, p. 150661, fev. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150661>.

GONÇALVES, M. W.; GAMBALE, P. G.; GODOY, F. R.; ALVES, A. A.; REZENDE, P. H. DE A.; CRUZ, A. D. DA; MACIEL, N. M.; NOMURA, F.; BASTOS, R.; MARCO-JR, P. DE. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: anura) ascertained by comet assay. **Zoologia**, v. 34, p. 1-8, 2017. <http://dx.doi.org/10.3897/zoologia.34.e19865>.

HADDAD, C. F. B. & PRADO, C. P. A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. **BioScience**. v. 55, n 3, p. 207-217, 2005.

HEGDE, G; KRISHNAMURTHY, S. V; BERGER, G. Common frogs response to agrochemicals contamination in coffee plantations, Western Ghats, India. **Chem Ecol**, v. 35, p. 397 – 407, 2019.

IPÉREZ, J. M. G. ; FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; NATALE, G. S.; OLIVEIRA, C. DE; BRODEUR, J. C.; LARRAMENDY, M. L. Multiple Level Effects Of Imazethapyr On *Leptodactylus latinasus* (Anura) Adult Frogs. **Research Square**, p. 1-25, 2021. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-227544/v1>.

IUCN. IUCN Red List of Treated Species. **www.iucnredlist.org** – Ultimo acesso em 10 de jan de 2022.

JOSENDE, M. E.; TOZETTI, A. M.; ALALAN, M. T.; MATHIES FILHO, V.; XIMENEZ, S. da S.; SILVA JÚNIOR, F. M. R. da; MARTINS, S. E. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>.

KNAPP, R. A.; FELLERS, G. M.; KLEEMAN, P. M.; MILLER, D. A. W.; VREDENBURG, V. T.; ROSENBLUM, E. B.; BRIGGS, C. J. Large-scale recovery of an endangered amphibian despite ongoing exposure to multiple stressors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 113, n. 42, p. 11889-11894, 2016. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1600983113>.

LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. 4. ed. São Paulo: **Átomo**, 2016

LÓPEZ-GONZÁLEZ, E. C.; LARRIERA, A.; SIROSKI, P. A.; POLETTA, G. L. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman)

hatchlings after embryonic exposure to diferente pesticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 84-91. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>.

LOURENÇO-DE-MORAES, R.; MALAGOLI, L. R.; GUERRA, V.; FERREIRA, R. B.; AFFONSO, I. de P.; HADDAD, C. F. B.; SAWAYA, R. J.; BASTOS, R. P. Nesting patterns among Neotropical species assemblages: can reserves in urban areas be failing to protect anurans?. **Urban Ecosystems**, v. 21, n. 5, p. 933-942, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s11252-018-0767-5>.

LUCAS, E. M. & GARCIA, P. C. A. Amphibia, Anura, Hylidae Rafinesque, 1815 and Hylodidae Günther, 1858: distribution extension and new records for Santa Catarina, southern Brazil. **Check List**, v. 7, p. 13–16. 10.15560/7.1.13. 2011.

MAPA. Brasil. Coordenação Geral de Agrotóxicos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registros concedidos 2005-2021**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Último acesso em janeiro de 2022.

MARTINAZZO, L. N. História ambiental do Alto Uruguai: colonização, desenvolvimento e transformações na paisagem. Lajeado, Centro Universitário **UNIVATES**, 2011

MÉNDEZ, S. I. S.; TILLITT, D. E.; RITTENHOUSE, T. A. G.; SEMLITSCH, R. D. Behavioral Response and Kinetics of Terrestrial Atrazine Exposure in American Toads (*Bufo americanus*). **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 57, n. 3, p. 590-597, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-009-9292-0>.

MILLER, D. A. W.; GRANT, E. H. C.; MUTHS, E.; AMBURGEY, S. M.; ADAMS, M.I J.; JOSEPH, M. B.; WADDLE, J. H.; JOHNSON, P. T. J.; RYAN, M. E.; SCHMIDT, B. R. Quantifying climate sensitivity and climate-driven change in North American amphibian communities. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06157-6>.

MIRZAEI, R.; YUNESIAN, M.; NASSERI, S.; GHOLAMI, M.; JALILZADEH, E.; SHOEIBI, S.; BIDS SHAHI, H. S.; MESDAGHINIA, A. An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology- central composite design. **Journal Of Environmental Health Science And Engineering**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2017. <http://dx.doi.org/10.1186/s40201-017-0282-2>.

MOONEY, T. J.; PEASE, C. J.; HOGAN, A. C.; TRENFIELD, M.; KLEINHENZ, L. S.; HUMPHREY, C.; VAN DAM, R. A.; HARFORD, A. J. Freshwater chronic ammonia toxicity: a tropical-to-temperate comparison. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 177-189, 2018. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4313>.

O'HANLON, S. J.; RIEUX, A.; FARRER, R. A.; ROSA, G. M.; WALDMAN, B.; BATAILLE, A.; KOSCH, T. A.; MURRAY, K. A.; BRANKOVICS, B.; FUMAGALLI, M. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, v. 360, n. 6389, p. 621-627, 2018. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aar1965>.

OLIVEIRA, M. de; MOSER, C. F.; AVILA, F. R. de; BUENO, J. A.; TOZETTI, A. M. Diet of *Aplastodiscus perviridis* Lutz 1950 (Anura, Hylidae) in subtemperate forests of southern

Brazil. **Neotropical Biology And Conservation**, v. 12, n. 3, p. 1-4, 2017. <http://dx.doi.org/10.4013/nbc.2017.123.03>.

PAVAN, F. A.; SAMOJEDEN, C. G.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; FRÉ, S. P. da; MÜLLER, C.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 85, p. 103637, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>.

PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; TEGLIA, C. M.; MARTINUZZI, C.; CURI, L.; CULZONI, M. J.; GOICOECHEA, H. C. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 51, p. 114-123, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>.

PELUSO, J.; ARONZON, C. M.; ACQUARONI, M.; COLL, C. S. P. Biomarkers of genotoxicity and health status of *Rhinella fernandezae* populations from the lower Paraná River Basin, Argentina. **Ecological Indicators**, v. 117, p. 106588, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106588>.

PELUSO, J.; COLL, C. S. P.; ARONZON, C. M. In situ exposure of amphibian larvae (*Rhinella fernandezae*) to assess water quality by means of oxidative stress biomarkers in water bodies with different anthropic influences. **Chemosphere**, v. 271, p. 129598, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129598>.

PHUNG, T. X.; NASCIMENTO, J. C. S.; NOVARRO, A. J.; WIENS, J. J. Correlated and decoupled evolution of adult and larval body size in frogs. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, n. 1933, p. 20201474, 2020. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2020.1474>.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. DE S. E.; LARA, S. S. DE; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. DA C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

PLANO DE MANEJO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO RIO GRANDE DO SUL – RS. Prefeitura Municipal de Sertão (Secretaria Municipal de Agricultura e Desenvolvimento Econômico), 2015. Disponível em: <https://www.sertao.rs.gov.br/pagina/561/parque-natural-municipal-de-sertao>. Acesso em: 07 set. 2021.

QUARANTA, A.; BELLANTUONO, V.; CASSANO, G.; LIPPE, C. Why Amphibians Are More Sensitive than Mammals to Xenobiotics. **Plos One**, v. 4, n. 11, p. 7699, 2009. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>.

ROCHA, M. C. da; SANTOS, M. B. dos; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; GONÇALVES, A. S.; SCHUCH, A. P. Preserved riparian forest protects endangered forest-specialists amphibian species against the genotoxic impact of sunlight and agrochemicals. **Biological Conservation**, v. 249, p. 108746, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108746>.

ROY, D.. Amphibians as environmental sentinels. **Journal Of Biosciences**, v. 27, n. 3, p. 187-188, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02704906>.

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. 2020.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, V. J.; AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J.; DORNELLES, M.; HARTMANN, P. A.; MULLER, C.; LORO, V. L.; HARTMANN, M. T. Cypermethrin- and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1, 2020b.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, VRANDRIELI J.; DO AMARAL, A. M.B.; LEITEMPERGER, J.; DORNELES, M.; HARTMANN, P. A.; MÜLLER, C.; LORO, V. L.; HARTMANN, M. T. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. **CHEMOSPHERE**, v. 250, p. 126 -162, 2020a.

SLAVIERO, L. B.; BUDKE, J. C.; CANSIAN, R. L. As florestas do Parque Natural Municipal de Sertao. In: TEDESCO, C. D.; ZANELLA, N. (Org.). **Parque Natural Municipal de Sertao**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, p. 41-68, 2014.

TEDESCO, C. D.; ZANELLA, N. **Parque Municipal de Sertão**. Ed: 1. Pg: 133. ISBN: 978-857515-865-4. 2014.

TEKLU, BERHAN M.; ADRIAANSE, PAULIEN I.; BRINK, PAUL J. VAN DEN. Monitoring and risk assessment of pesticides in irrigation systems in Debra Zeit, Ethiopia. **Chemosphere**, [S.L.], v. 161, p. 280-291, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.031>.

TRAPP, M.; DEUBERT, M.; STREIB, L.; SCHOLZ-STARKE, B.; ROß-NICKOLL, M.; TOSCHKI, A. Simulating the Effects of Agrochemicals and Other Risk-Bearing Management Measures on the Terrestrial Agrobiodiversity: the riskmin approach. **Innovations In Landscape Research**, p. 443-459, 2020. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-37421-1_23.

VANZETTO, G. V.; SLAVIERO, J.; STURZA, P. F.; RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; KOLCENTI, C.; HARTMANN, P. A.; FERREIRA, C. M.; HARTMANN, M. T. Toxic effects of pyrethroids in tadpoles of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **ECOTOXICOLOGY**, p. 1-10, 2019.

WALLS, S. C.; BLAUSTEIN, A. R.; BEATTY, J. J. Amphibian biodiversity of the Pacific Northwest with special reference to late-seral stands. **Northwest Environ**, v. 8, p. 53-69, 1992.

WELSH, H. H.; OLLIVIER, L. M. Stream Amphibians as Indicators of Ecosystem Stress: a case study from california's redwoods. **Ecological Applications**, v. 8, n. 4, p. 1118, 1998. <http://dx.doi.org/10.2307/2640966>.

ZAMORA-CAMACHO, F. J. The relationships between toad behaviour, antipredator defences, and spatial and sexual variation in predation pressure. **Peerj**, v. 10, p. 12985, 2022. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.12985>.

ZANELLA, N.; PAULA, A. de; GUARAGNI, S. A.; MACHADO, L. de S. Herpetofauna do Parque Natural Municipal de Sertão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 4, p. 290-298, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-06032013000400026>.

ZHELEV, Z. M.; TSONEV, S. V.; ARNAUDOVA, D. N. Health status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria: body condition factor and fluctuating asymmetry. **ACTA ZOOLOGICA BULGARICA**, v. 1, p. 169–176, 2017.

**INFLUÊNCIA DO GRAU DE CONSERVAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO DE ANFÍBIOS
EM RIACHOS NO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO, SUL DO
BRASIL**

**THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL INTEGRITY IN THE DISTRUBUTION
OF STREAM-DWELLING AMPHIBIANS IN THE NATURAL PARK OF SERTÃO,
SOUTHERN BRAZIL**

RESUMO

A constante perda e degradação de ambientes florestais do bioma Mata Atlântica, ocasionado principalmente pela expansão agrícola, resultou em declínio nas populações de vertebrados e, dentre estes, dos anfíbios. O objetivo deste estudo foi avaliar a riqueza e composição de espécies de anfíbios em riachos sob diferentes graus de conservação no Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) e seu entorno, no sul do Bioma Mata Atlântica. Foram selecionados três ambientes sendo, Interior, Borda e Entorno e em cada ambiente três pontos amostrais. As amostragens foram realizadas de dezembro de 2021 a abril de 2022. Foram estimadas a riqueza, a diversidade e a composição da anurofauna para cada ponto amostral. Foram registradas 11 espécies de anfíbios que utilizam os riachos do PNMS e um total de 91 indivíduos. O ambiente do Interior apresentou maior riqueza, seguido pelo ambiente de Borda e entorno. A diversidade no Entorno foi significativamente menor que nos ambientes de Interior e Borda. Todas as espécies dependentes de riachos foram registradas no Interior. Espécies não dependentes de riacho foram mais registradas no Entorno. Apenas duas espécies compartilham os três ambientes. De acordo com a classificação do protocolo de avaliação rápida (PAR) os ambientes de Interior e Borda se classificam como natural e o Entorno como alterado. Nossos resultados mostram que o grau de conservação dos riachos é atributo importante para manutenção da diversidade de anfíbios, principalmente para aqueles que são dependentes reprodutivamente destes ambientes. O PNMS apresenta características para a conservação das espécies de anuros de riachos nos ambientes de Interior e Borda. Porém, as características do Entorno, em função do menor grau de conservação, limitam a ocupação dos riachos pelos anfíbios.

PALAVRAS-CHAVE: Anuros. Conservação. Mata Atlântica. Unidade de conservação.

ABSTRACT: The intense deforestation and fragmentation in the Atlantic Forest caused by logging, agricultural and livestock activities may lead to decline of the vertebrate species, mainly amphibians. The goal of this study was to evaluate how anuran species composition and richness varies in streams with various levels of environmental integrity in the Natural Park of Sertao (NPS) and surrounding, in the northern part of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Nine transects were selected along the three sample areas: Core, Edge, and Buffer area of the Natural Park of Sertao. Samples were taken from December 2021 to April 2022. We registered the species composition, diversity, and richness of anurans in each stream. We found a total of 11 anuran species and 91 individuals in the streams of the Park and surrounding. The Core area showed higher richness, followed by Edge area and Core area. The diversity in the Buffer area was lower than Core and edge areas. All stream-dwelling species occurred in the Core area, and not stream-dwelling species occurred mainly in the Buffer area. Only two species occurred in the areas. According to the rapid river assessment protocol score (RAP), the Core and Edge areas were classified as natural, and the Buffer area as altered. Our results Show that the levels of environmental integrity of the streams are important features to anurans conservation, mainly to stream-dwelling species. The NPS represents an important remnant of native forest in a highly fragmented region and one refuge to regional anuran fauna. However, the features of the Buffer area can limit the occurrence of more demanding species that are usually associated with well-preserved habitats.

Key words: Anurans; conservation, Atlantic Forest, Protected area.

1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais e subtropicais estão diminuindo em escala sem precedentes devido à expansão agrícola, à extração de madeira, caça e coleta de produtos florestais não-madeireiros (GIBBS *et al.*, 2010; KLEINSCHROTH *et al.*, 2016; PENDRIL *et al.*, 2022). Essas ações antrópicas promovem paisagens alteradas, com aumento de áreas florestais degradadas e fragmentadas (ELLIS *et al.*, 2010; ROZENDAAL *et al.*, 2019). No Brasil, a vegetação natural foi reduzida em 13 % entre 1985 e 2021 (84,7 milhões de hectares) e nos últimos 30 anos 60 milhões de hectares de vegetação nativa foram convertidos em pastagem (MAPBIOMAS, 2022).

O bioma Mata Atlântica é um dos *hots-pots* de biodiversidade mais ameaçados do mundo (JOLY *et al.*, 2014), restando apenas 12,4% da floresta que existia originalmente (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2021). A Mata Atlântica abrange cinco tipos de formações florestais: Ombrófila Aberta, Ombrófila Mista, Ombrófila Densa, Estacional Decidual e Estacional Semidecidual (OLIVEIRA-FILHO, 2000; MARCILIO-SILVA *et al.*, 2018). Após cinco séculos de ocupação humana, estas formações florestais estão distribuídas numa paisagem composta principalmente por fragmentos florestais de pequeno porte (<50 ha) e cercados por matriz de agricultura, pastagem e áreas urbanas (JOLY *et al.*, 2014). Na região sul do Bioma Mata Atlântica, no norte do Estado do Rio Grande do Sul, denominada região do Alto Uruguai, a perda de cobertura das florestas nativas foi mais intensa a partir da década de 1940, devido à expansão e ocupação das terras pela agropecuária e extração de madeira (MARTINAZZO, 2011).

A região estudada, originalmente coberta por floresta ombrófila mista, foi amplamente fragmentada e degradada, restando remanescentes de maior porte somente em áreas protegidas (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2015). Nestas áreas protegidas a paisagem é composta por áreas de vegetação primitiva intercalada com florestas secundárias em variados estágios de regeneração. Estas áreas, mesmo que fragmentadas ou parcialmente degradadas, são importantes para manutenção da diversidade regional, pois representam os últimos refúgios para as espécies, principalmente para vertebrados nativos que dependem de áreas florestais (BURIVALOVA *et al.*, 2014; EDWARDS *et al.*, 2014; MIKOLAICZIK *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020; BETIOL *et al.*, 2022).

Anfíbios estão entre os grupos de vertebrados com maior declínio populacional e estima-se que um quinto das espécies estão extintas ou à beira da extinção (CEBALLOS *et al.*, 2020). Os declínios populacionais dos anfíbios são causados principalmente pela fragmentação de habitats, perda da cobertura florestal e infecção fúngica causada pelo *Batrachochytrium dendrobatidis* (MILLER *et al.*, 2018; CARVALHO, 2017; BELASEN *et al.*, 2022).

Os anfíbios de ambiente florestais respondem negativamente a degradação ambiental (ANUNCIACÃO *et al.*, 2021). A degradação na qualidade dos habitats utilizados para reprodução ou como refúgio pelos anfíbios limita as populações mais exigentes no uso do ambiente (ALMEIDA *et al.*, 2020). Espécies de anfíbios que ocupam florestas em regiões altamente fragmentadas podem ficar restritas a parcelas pequenas do ambiente ou serem excluídas local e regionalmente (BECKER *et al.*, 2007; HARRISON e BRUNA, 2012; ALMEIDA-GOMES, 2014).

Os anfíbios que utilizam riachos para sua reprodução tendem a ser especializados em seu uso de habitats além de apresentarem baixa capacidade de dispersão entre os mananciais hídricos (WELSH e OLLIVIER, 1998; CAYUELA *et al.*, 2015). Fatores como estrutura e complexidade da vegetação ripária, diversidade de habitats no substrato do córrego e qualidade da água são fatores que influenciam a distribuição e abundância destas espécies (HAMER e PARRIS, 2011; JORDAN *et al.*, 2016). Estas características implicam maior suscetibilidade as mudanças ambientais e, por consequência, menor potencial para resistir as alterações no ambiente. A degradação na qualidade do habitat e consequente diminuição no grau de conservação de riachos pode diminuir o potencial reprodutivo dos anfíbios que necessitam desses locais, promovendo alterações na estrutura e composição destas comunidades (DUARTE *et al.*, 2012; BERRIOZABAL-ISLAS *et al.*, 2018; DALMOLIN *et al.*, 2020).

Compreender como os anfíbios de riachos se distribuem em ambientes florestais com diferentes graus de conservação possibilita identificar as espécies mais ameaçadas pela degradação do ambiente. Estas informações podem servir de base para políticas ambientais e ações de conservação, principalmente em áreas protegidas. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição da riqueza e a composição de espécies de anfíbios em riachos com diferentes

graus de conservação em um remanescente florestal e seu entorno, no sul do Bioma Mata Atlântica.

2 METODOLOGIA

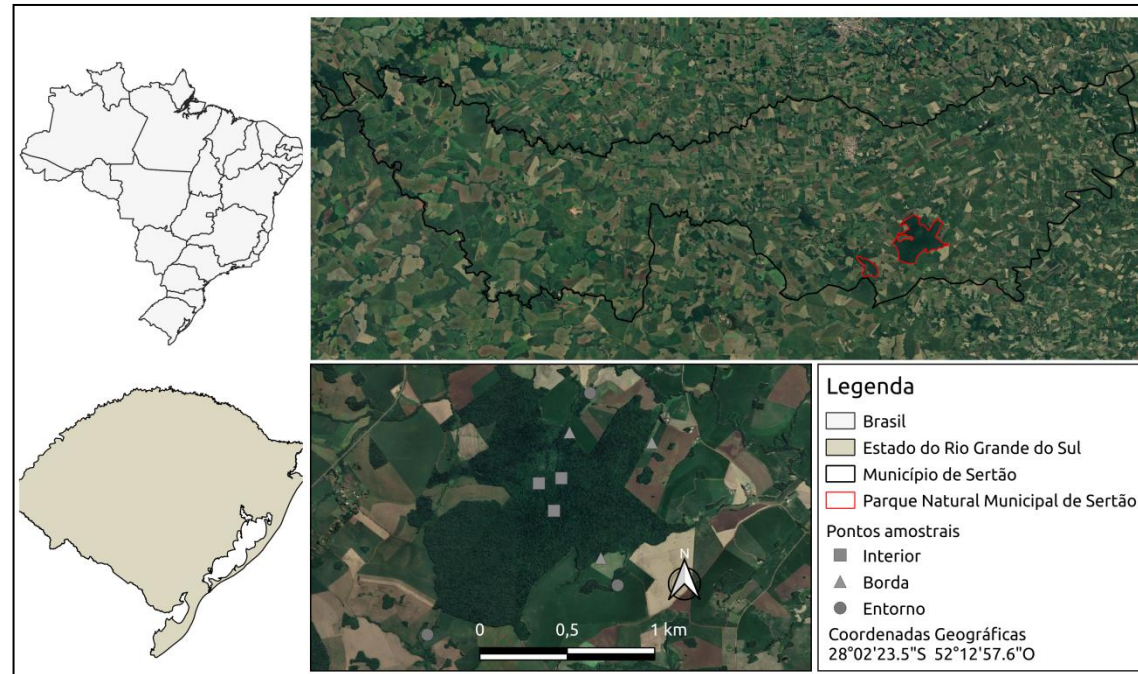
2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Parque Natural do Municipal de Sertão (PNMS) (28°02'27.6"S, 52°12'58.1"W) e seu entorno, na região norte do Estado do Rio Grande do Sul (RS), município de Sertão. O PNMS é uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral com 590,80 ha (Figura 1) e representa a maior área de floresta nativa da região do Alto Uruguai (TEDESCO & ZANELLA, 2014).

A área do PNMS apresenta relevo levemente ondulado, com uma altitude aproximada de 650 m (PLANO DE MANEJO DO PARQUE, 2015). O clima apresenta temperatura média de 16,5°C, mínimas de 4°C e máximas de 31°C com precipitação no ano de 1.350 mm (EMBRAPA, 2021). A vegetação conserva as características típicas da Floresta Ombrófila Mista, com diversas espécies compondo um dossel denso, de onde emergem as grandes Araucárias (TEDESCO & ZANELLA, 2014).

O PNMS é constituído de dois fragmentos florestais (513 ha e 77 ha). O estudo foi realizado no maior fragmento e nos remanescentes florestais no seu entorno. O entorno do PNMS é caracterizado por propriedades rurais de economia agrícola (Figura 1) com predomínio de plantações de soja, trigo, milho e aveia (PLANO DE MANEJO DO PARQUE, 2015).

Figura 1 – Parque Natural Municipal de Sertão e distribuição das áreas amostrais. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Para a coleta de dados foram selecionados três riachos em cada um dos três ambientes estruturalmente diferentes no PNMS e seu entorno (ver abaixo). Estas áreas foram denominadas como Interior, Borda e Entorno.

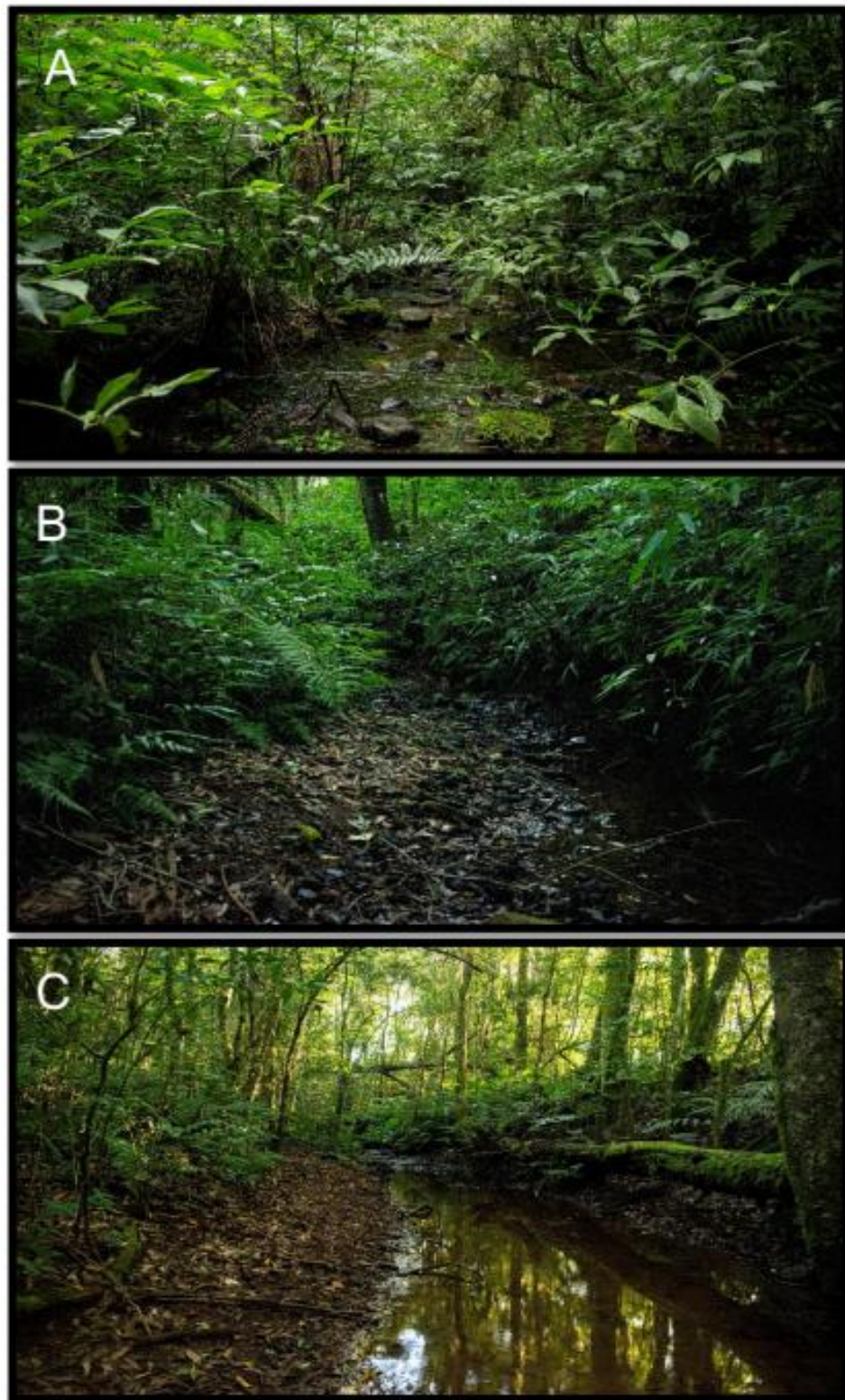
O ambiente do Interior (Figura 2A) caracteriza-se por ser o local onde ocorrem as nascentes no PNMS. Nesta área predomina o estágio de regeneração avançado, podendo ser considerados os locais mais preservados do PNMS (SLAVIERO *et al.*, 2014). É o local onde estão as árvores mais altas e com maior largura de vegetação ripária nos riachos, diminuindo à medida que se aproxima da borda do fragmento florestal (SLAVIERO *et al.*, 2014).

O ambiente de Borda (Figura 2B) representa a transição entre a vegetação florestal e a matriz agrícola. A composição e a abundância da vegetação demonstram ser influenciadas pelo gradiente de borda, apresentando uma separação parcial entre ambientes. Este ambiente é caracterizado pelo estágio de regeneração intermediário, nas áreas próximas a matriz e estágio avançado, nas áreas mais próximas do interior do fragmento (SLAVIERO *et al.*, 2014).

O ambiente do Entorno (Figura 2C) caracteriza-se por estar circundado pela matriz agrícola. São fragmentos alongados, estreitos (variando de 50 a 160 metros de largura), que estão sujeitos ao efeito de borda, que na maioria dos casos, influencia toda área do fragmento.

Predomina vegetação em estágio de regeneração intermediário, com locais de estágio de regeneração inicial nas bordas.

Figura 2 - Ambientes de Interior (A), Borda (B) e Entorno (C) do Parque Natural Municipal de Sertão. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

2.2 COLETA DE DADOS

Para registro de riqueza de espécies e número de indivíduos de anfíbios anuros, foram estabelecidos transectos com 150 metros de comprimento em cada um dos nove riachos (três por área; Figura 1). Os transectos foram percorridos por dois observadores pelo período de aproximadamente uma hora, entre 20:00 e 24:00 horas. Sempre que possível foram amostrados dois riachos por noite, alternando o horário de início das amostragens entre os córregos. As amostragens ocorreram de dezembro de 2021 a abril de 2022. No total, foram realizadas quatro (04) amostragens em cada córregos, totalizando 36 dias amostrais.

Todos os indivíduos vistos e ouvidos até cinco (05) metros da margem dos riachos, foram registrados e quando possível, fotografados. O limite de cinco (5) metros foi estabelecido para excluir o registro de espécies que não sejam ecologicamente associadas aos córregos. A identificação das espécies foi realizada no local, quando possível, ou por fotografia. A nomenclatura e a classificação taxonômica seguem a Lista de Espécies Brasileiras, organizada pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SEGALLA *et al.*, 2021). O estudo teve autorização de pesquisa nº 73994-2 – SISBIO e autorização pelo comitê de uso de animais da UFFS AUA nº3795020321.

Para este estudo categorizamos as espécies como dependentes de riachos (espécies que obrigatoriamente usam riachos em alguma etapa do evento reprodutivo) e espécies não dependentes de riachos (mas que podem usar riacho para outras atividades). Para tal foi utilizada a classificação de modos reprodutivos indicados em Haddad & Prado (2005), Caldart *et al.* (2010) e Potrich *et al.* (2021). As espécies foram classificadas em grau de ameaça conforme a IUCN (2022) e Lista Oficial de Espécies da Fauna e Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2022).

O grau de conservação de cada riacho foi analisado por meio do protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats para trechos de bacias hidrográficas (PAR) desenvolvido por Callisto *et al.* (2002), adaptado dos protocolos propostos pela Agência de Proteção Ambiental de Ohio, EUA (EPA, 1987) e Hannaford *et al.* (1997). O protocolo avalia um conjunto de parâmetros ambientais conforme as categorias descritas no Anexo 1. A partir do valor do somatório dos parâmetros é possível classificar grau de conservação do ambiente da mata ripária, que pode ser classificando como impactado, quando a pontuação for de 0-40,

alterado quando ficar entre 41-60 e como natural, se for acima de 61 (CALLISTO *et al.*, 2002). Os resultados do PAR serviram para análises considerando os diferentes graus de conservação nos córregos em cada área amostral (Interior, Borda e Entorno).

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A distribuição dos dados foi testada pelo teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov. No caso de dados de distribuição normal e homogeneidade foi aplicado o teste de Shanon-Wiener (H) para o índice de diversidade. A diferença na pontuação do PAR entre as áreas amostrais foi analisada pelo teste de qui quadrado. Todas as análises foram feitas no RStudio Team (2020). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como referência para significância estatística.

3 RESULTADOS

Foram registradas 11 espécies de anfíbios nos riachos no PNMS e entorno (Tabela 1) totalizando 91 indivíduos. O ambiente do Interior foi o que teve maior riqueza (N=8 espécies) seguido pela Borda (N=7) e do ambiente do Entorno (N=5). A diversidade de anuros foi maior no ambiente do Interior (H=1,85) seguido por Borda (H=1,59) e entorno (H=0,90). A diversidade no Entorno foi significativamente menor que nos ambientes de Interior e Borda ($p < 0,01$). Não houve diferença na diversidade entre os ambientes de Interior e Borda ($p > 0,05$).

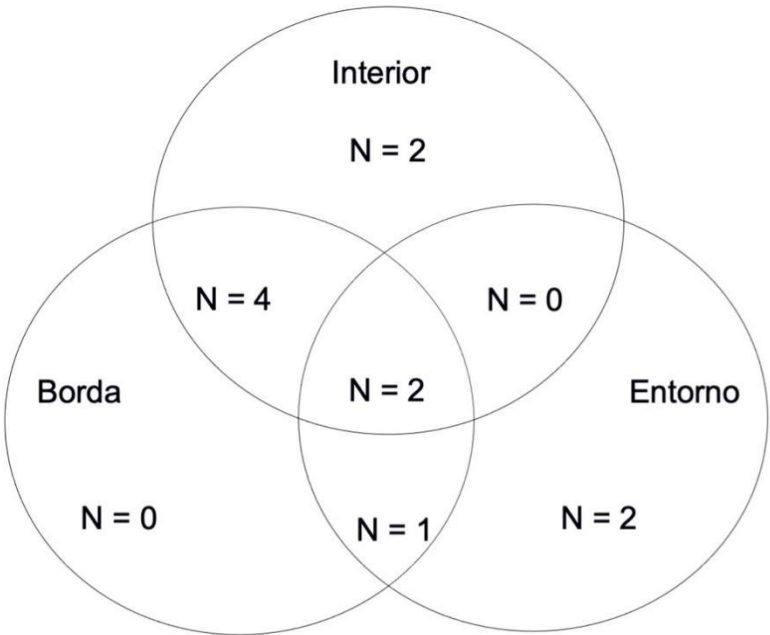
Cinco espécies foram consideradas dependentes de riachos e seis podem utilizar outros ambientes além de riachos (Tabela 1). Todas as espécies dependentes de riachos foram registradas no Interior (N=5). Na Borda foram registradas quatro espécies dependentes de riachos e somente uma no Entorno. As espécies não dependentes de riacho foram mais registradas no Entorno (N=4), porém também ocorreram na Borda e Interior (N=3).

Tabela 1: Famílias, espécies e número de indivíduos de anfíbios anuros por ambiente (Interior, Borda e Entono) e status de conservação (MMA, 2022) registrados em riachos no Parque Natural Municipal de Sertão. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul. DR – Espécie dependente de riacho (S –sim, N – não); LC - poupo preocupante; NT - quase ameaçada; EN – em perigo.

Familia/espécie	INTERIOR	BORDA	ENTORNO	DR	STATUS
Brachycephalidae					
<i>Ischnocnema henselii</i>	3	14	-	N	LC
Bufonidae					
<i>Melanophryniscus devincenzii</i>	1	-	-	S	EN
<i>Rhinella icterica</i>	-	-	2	N	LC
Centrolenidae					
<i>Vitreorana uranoscopa</i>	1	9	-	S	LC
Hylidae					
<i>Aplastodiscus perviridis</i>	7	1	3	N	LC
<i>Boana curupi</i>	4	7	20	S	LC
<i>Dendropsophus minutus</i>	1	-	-	N	LC
<i>Scinax fuscovarius</i>	-	-	1	N	LC
Hylodidae					
<i>Crossodactylus schmidt</i>	3	9	-	S	LC
Leptodactylidae					
<i>Leptodactylus lucatator</i>	-	1	1	N	LC
Odontophrynidae					
<i>Proceratophrys bigibbosa</i>	2	1	-	S	NT
Número de espécies	8	7	5	-	-
Número de indivíduos	22	42	27	-	-

Apenas duas espécies foram encontradas em todos os ambientes (*Aplastodiscus perviridis* e *Boana curupi*; Figura 3). O ambiente de Interior mostrou duas espécies exclusivas (*Melanophryniscus devincenzii* e *Dendropsophus minutus*), assim como o ambiente de Entorno (*Rhinella icterica* e *Scinax fuscovarius*). Nenhuma espécie foi exclusiva do ambiente de Borda. Os ambientes de Interior e Borda compartilharam o maior número de espécies (N=6; Figura 3). Duas espécies foram classificadas como ameaças de extinção: *M. devincenzii* é classificada como em perigo e *Proceratophrys bigibbosa* como quase ameaçada (NT) (Tabela 2). A espécie mais abundante foi *B. curupi* (N=31), que ocorreu nos três ambientes amostrados (Interior, Borda e Entorno).

Figura 3 – Número de espécies de anfíbios anuros compartilhadas e exclusivas nos ambientes do Interior, Borda e Entorno. Parque Natural Municipal de Sertão. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A pontuação do PAR ficou entre 92 e 53 pontos. Os riachos nos ambientes de Interior tiveram maior pontuação (PAR = 92; 90; 88), seguido dos ambientes de Borda (PAR = 64; 64; 88) e dos ambientes de Entorno (PAR = 53; 53; 53). Houve diferença no PAR entre os ambientes analisados PNMS ($X^2 = 34.13$, Gl = 8, $p < 0,001$). De acordo com a classificação

do PAR os ambientes de Interior e Borda se classificam como natural e o Entorno como alterado.

4 DISCUSSÃO

O número de espécies de riacho encontrado neste estudo (N=11) é semelhante ao registrado em outros estudos, no PNMS e em regiões próximas. De acordo com o Plano de Manejo, 23 espécies podem ocorrer no PNMS, quando são considerados todos os tipos de ambientes do (lênticos e lóticos; ZANELLA *et al.*, 2013). No entanto, somente 12 espécies apresentam modo reprodutivos associados a riachos, ou ocupam riachos de forma eventual (ZANELLA *et al.*, 2013, POTRICH *et al.*, 2020). Da mesma forma, em trabalho recente em região próxima, como foco em anfíbios de riachos, foi encontrado número semelhantes de espécies (N=10 espécies; ALMEIDA *et al.*, 2020).

As respostas de anfíbios à variação nas condições dos riachos estão fortemente ligadas à sua história de vida e, principalmente, aos seus modos reprodutivos (GOULD e PETERMAN, 2021). Anuros podem ser afetados pelas modificações na estrutura da paisagem e espécies mais exigentes podem ser restringidas de acordo com a qualidade do ambiente (ANCIUTTI *et al.*, 2019), necessitando de cobertura vegetal mais integrada para reprodução e desenvolvimento. Neste sentido, espécies que se reproduzem em riachos, em função das especificidades do habitat em que reproduzem (CARILO FILHO *et al.*, 2021), dificilmente utilizam ambientes estruturalmente diferentes (SUÁREZ *et al.*, 2016).

A maior riqueza e diversidade no Interior e na Borda parece estar associado ao uso destas áreas por espécies que são dependentes de riachos, associadas a outras que ocupam eventualmente. As cinco espécies dependentes de riachos foram registradas nos ambientes de Interior e quatro destas no ambiente de Borda. Além disto, estas duas áreas são as que mais compartilham espécies (N=6). No entanto, a Borda não apresentou uma das espécies dependentes de riachos (*M. devincenzii*), nem espécies exclusivas.

O PAR indica que os ambientes de Interior e Borda, por serem categorizados como “natural”, apresentam, dentre outras características, menos alterações antrópicas, maior diversidade e heterogeneidade de habitat, além de vegetação ripária nativa larga e mais conservada, quando comparados com o Entorno. Estas características são importantes para

espécie que usam os riachos (JORDAN *et al.*, 2016; VALERIO *et al.*, 2016; DALMOLIN *et al.*, 2020) e podem potencializar o uso destas áreas por espécies mais exigentes no uso do ambiente. Principalmente as espécies *C. schmidt*, *M. devincenzii*, *P. bigibbosa* e *V. uranoscopa*, que são dependentes de riachos (CALDART *et al.*, 2010; ZANELLA *et al.*, 2013; GETELINA, 2021), além de *Ischnocnema henselii* (KWET e SOLE, 2005), que tem desenvolvimento direto, parecem estar restritas a locais com maior grau de conservação - Interior e Borda. As duas espécies ameaçadas de extinção registradas neste estudo estão com as populações em declínio (IUCN, 2022), fato que necessita de atenção.

Das espécies dependentes de riachos somente *B. curupi* foi encontrada no Entorno, inclusive em maior número que nas outras áreas (N=20). *Boana Curupi*, embora apresente modo reprodutivo exclusivo de ambiente lótico (GARCIA, 2007), tem sido registrada associada a ambientes de borda de floresta e áreas abertas próximas fragmentos florestais (ALMEIDA *et al.*, 2020; POTRICH *et al.*, 2021). Estes registros, assim como os deste estudo, indicam que esta espécie tem capacidade de ocupar ambientes com variados graus de conservação.

Os nossos resultados mostram que o Entorno se diferencia das outras dois ambientes pela menor riqueza e diversidade. Além disto, no entorno foi encontrada somente uma espécie dependente de riachos e maior número de espécies não dependentes de riachos. O Entorno foi categorizado como “alterado”, o que significa que, dentre outras características, apresenta mais alterações antrópicas, mata ripária menor que 15 metros e menor diversidade de habitats. Tais alterações podem impedir que espécies mais exigentes no uso do habitat ocupem estas áreas. Mesmo as duas espécies exclusivas dos ambientes do Entorno (*Rhinella icterica* e *Scinax Fuscovarius*) são típicas de áreas abertas e de charcos e usam riachos somente de forma eventual (KWET *et al.*, 2010; MANEYRO e CARREIRA, 2012).

Não é a primeira vez que o PAR é utilizado em estudos com anfíbios. Almeida *et al.* (2020) também aplicaram essa ferramenta para caracterizar riachos no interior e Entorno de uma unidade de conservação e compararam seus resultados com a riqueza e diversidade de espécies de anfíbios que utilizaram aqueles ambientes. De forma semelhante o registrado neste estudo, espécies generalistas ocupam ambientes alterados enquanto espécies mais

especializadas e dependentes de riachos ocuparam locais mais preservados de mata nativa (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Espécies generalistas podem se beneficiar de alterações antrópicas nos ambientes (WARREN *et al.*, 2001; ROONEY *et al.*, 2004; TUOMAINEN e CANDOLIN, 2011), ampliando sua distribuição em função do grau de alterações nos ambientes naturais. Este padrão é observado em ambientes abertos ou de charcos, que sofreram degradação na qualidade do ambiente. Nestes ambientes tende ocorrer a substituição de espécies especialistas por espécies generalistas, mantendo riqueza semelhante ou até mesmo maior que a original (do ambiente antes da degradação) (CARILO FILHO *et al.*, 2021; ZAMORA-MARÍN *et al.*, 2021).

Em ambiente de riachos parece ocorrer a exclusão de espécies mais exigentes em ambientes com menor grau de conservação, principalmente daquelas dependentes de riachos para reprodução. Porém, diferente dos ambientes abertos ou de charco, não parece ocorrer a substituição e entrada de outras espécies. O ambiente de riacho exige adaptações reprodutivas específicas, que a maioria das espécies de outros ambientes não dispõe (CARILO FILHO *et al.*, 2021). Esta condição resulta em, além de alterações na composição de espécies, menor riqueza e diversidade nos ambientes de riacho com menor grau de conservação.

Na região sul do Brasil, o número de espécies de anuros que necessitam de riachos para reprodução e desenvolvimento é relativamente baixo, variando entre oito e 11 (e. g. ANCIUTTI *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020). Talvez por esse motivo existam poucos estudos que se dedicam a entender o quanto estas espécies são afetadas pela fragmentação e degradação dos habitats de riacho. No entanto, este relativamente pequeno número de espécies reforça importância de mais estudos para entender a dinâmica da distribuição e abundância de espécies anfíbios de riachos nos remanescentes florestais no sul da Floresta Atlântica. Se o padrão encontrado neste estudo for recorrente para a região, a redução no grau de conservação dos riachos pode resultar em ambientes empobrecidos, além da extinção local e regional de espécies dependentes de riachos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostram que o grau de conservação dos riachos é atributo importante para manutenção da diversidade de anfíbios, principalmente para aqueles que são dependentes reprodutivamente destes ambientes. O PNMS apresenta características para a conservação das espécies de anuros de ambiente lóticos encontrados tanto no Interior quanto no ambiente de Borda. Porém, as características do Entorno, em função do menor grau de conservação, limitam a ocupação dos riachos pelos anfíbios. Em função disto, faz-se necessário estabelecer uma política de conservação nos fragmentos florestais no entorno do PNMS, com manutenção e recuperação das matas ripárias.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA-GOMES, M.; ROCHA, C. F. D. **Landscape connectivity may explain anuran species distribution in an Atlantic forest fragmented area.** Landscape Ecology, v. 29, n. 1, p. 29-40, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10980-013-9898-5>.

ALMEIDA, P. C.; HARTMANN, M. T.; HARTMANN, P. A. **How riparian forest integrity influences anuran species composition: a case study in the Southern Brazil Atlantic Forest.** Animal Biodiversity and Conservation, v. 43, n. 2, p. 209–219, 2020. <https://doi.org/10.32800/abc.2020.43.0209>.

ALMOND, R. E. A.; GROOTEN, M.; PETERSON, T. **Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss.** Gland, Switzerland: World Wildlife Fund. 2020.

ANCIUTTI, M. A. C.; BASTIANI, V. I. M.; MAGRO, J.; CARASEK, F. L.; BALDISSERA, R.; LUCAS, E. M. **Local and landscape factors affecting tadpole diversity in subtropical Atlantic Forest streams.** Austral Ecology, v. 44, n. 8, p. 1311-1321, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/aec.12775>.

Excluídos[bagnolo]:

ANUNCIAÇÃO, P. R.; BARROS, F. M.; RIBEIRO, M. C.; CARVALHO, L. M. T.; ERNST, R. **Taxonomic and functional threshold responses of vertebrate communities in the Atlantic Forest Hotspot.** Biological Conservation, v. 257, p. 109-137. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109137>.

BECKER, C. G.; FONSECA, C. R.; HADDAD, C. F. B.; BATISTA, R. F.; PRADO, P. I. **Habitat split and the global decline of amphibians.** Science, v. 318, p. 1775-1777, 2007.

BELASEN, A. M.; AMSES, K. R.; CLEMONS, R. A.; BECKER, C. G.; TOLEDO, L. F.; JAMES, TIMOTHY, Y. **Habitat fragmentation in the Brazilian Atlantic Forest is associated with erosion of frog immunogenetic diversity and increased fungal infections.** Immunogenetics. Springer Science and Business Media. v. 74, n. 4, p. 431-441, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-022-01252-x>.

BERRIOZABAL-ISLAS, C.; BADILLO-SALDAÑA, L. M.; RAMÍREZ-BAUTISTA, A.; MORENO, CLAUDIA E. **Effects of Habitat Disturbance on Lizard Functional Diversity in a Tropical Dry Forest of the Pacific Coast of Mexico.** Tropical Conservation Science, v. 10, p.81-94, 2017. <http://dx.doi.org/10.1177/1940082917704972>.

BETIOL, C. F. M. F.; HARTMANN, M. T.; HARTMANN, P. A. **CONSERVAÇÃO DE AVES NO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO.** Zoologia: Panorama atual e desafios futuros, p. 27-45, 2022. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.4972227053>.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 357**, de 15 de junho de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de

lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf. Ultimo acesso em 10 de mar 2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Cadastro Nacional de Unidades de Conservação**. Brasília: MMA, 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/cadastro-nacional-de-ucs>. Ultimo acesso em 10 de mar 2022.

BURIVALOVA, Z.; ŞEKERCIOĞLU, C. H.; KOH, L. P. **Thresholds of logging intensity to maintain tropical forest biodiversity**. *Current Biology*, v. 24, p. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.065>.

CALDART, V. M.; IOP, S.; SANTOS, T. G.; CECHIN, S. Z. **Extension of the geographical distribution of two anuran species for Rio Grande do Sul State, Brazil, with comments on natural history**. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 3, p. 143-147, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-06032010000300015>.

CALLISTO, M., FERREIRA, W. R.; MORENO, P., GOULART, M.; PETRUCIO, M. **Aplicação de um protocolo de avaliação rápida diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ)**. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002.

CARILO FILHO, L. M.; CARVALHO, B. T.; AZEVEDO, B. K. A.; GUTIÉRREZ-PESQUERA, L. M.; MIRA-MENDES, C. V.; SOLÉ, M.; ORRICO, V. G. D. **Natural history predicts patterns of thermal vulnerability in amphibians from the Atlantic Rainforest of Brazil**. *Ecology And Evolution*, v. 11, n. 23, p. 16462-16472, 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.7961>.

CARVALHO, F. P. **Pesticides, environment, and food safety**. *Food And Energy Security*, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/fes3.108>.

CAYUELA, H.; ARSOVSKI, D.; BOITAUD, S.; BONNAIRE, E.; BOUALIT, L.; MIAUD, C.; JOLY, P.; BESNARD, A. **Slow life history and rapid extreme flood: demographic mechanisms and their consequences on population viability in a threatened amphibian**. *Freshwater Biology*, v. 60, n. 11, p. 2349-2361, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/fwb.12661>.

CEBALLOS, G.; EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. **Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction**. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*. v. 117, n. 24, p. 13596-13602, 2020. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1922686117>.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Concea Normativa No 21**, de 20 de Março de 2015. Brasília, 2015.

DALMOLIN, D. A.; TOZETTI, A. M.; PEREIRA, M. J. R. **Turnover or intraspecific trait variation: explaining functional variability in a neotropical anuran metacommunity**. *Aquatic Sciences*. p. 82:62, 2020.

DUARTE, H.; TEJEDO, M.; KATZENBERGER, M.; MARANGONI, F.; BALDO, D.; BELTRÁN, J. F.; MARTÍ, D. A.; RICHTER-BOIX, A.; GONZALEZ-VOYER, A. **Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities.** *Global Change Biology*, v. 18, n. 2, p. 412-421, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02518.x>.

EDWARDS, D. P., TOBIAS, J. A., & SHEIL, D., MEIJAARD, E., & LAURANCE, W. F. **Maintaining ecosystem function and services in logged tropical forests.** *Trends in Ecology & Evolution*. v. 29, p. 511– 520, 2014.

ELLIS, E. C.; GOLDEWIJK, K. K.; SIEBERT, S.; LIGHTMAN, D.; RAMANKUTTY, N. **Anthropogenic transformation of the biomes, 1700 to 2000.** *Global Ecology And Biogeography*. p. 1-10, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00540.x>.

EMBRAPA. **Embrapa trigo – setor de meteorologia.** Passo Fundo, RS. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/app/principal/graficos.php>. Último acesso em 24 fev. 2022.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2019/2020, relatório técnico.** São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2021. 73p. 2022.

GARCIA, P. C. A.; FAIVOVICH, J. N.; HADDAD, C. F. B. **Redescription of *Hypsiboas Semiguttatus*, with the Description of a New Species of the *Hypsiboas pulchellus* Group.** *Copeia*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH). v. 2007, n. 4, p. 933-949, 2007. [http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511\(2007\)7\[933:rohswt\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511(2007)7[933:rohswt]2.0.co;2).

GETELINA, M. A.; SCHWANTES, J. B.; GRAICHEN, D. A. S. **Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an endangered forest-specialist anuran.** *Hydrobiologia*. v. 849, p. 2463-2475, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04840-w>.

GIBBS, H. K.; RUESCH, A. S.; ACHARD, F.; CLAYTON, M. K.; HOLMGREN, P.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J. A. **Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s.** *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*. v. 107, n. 38, p. 16732-16737, 2010. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910275107>.

GOULD, P. R.; PETERMAN, W.E. **Life history mediates the effects of habitat variation on salamander abundance: a multiscale assessment.** *Landscape Ecology*. v. 36, n. 3, p. 749-761, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s10980-020-01167-6>.

HADDAD, C. F. B. & PRADO, C. P. A. **Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil.** *BioScience*. v. 55, n 3, p. 207-217, 2005.

HAMER, A. J.; PARRIS, K. M. **Local and landscape determinants of amphibian communities in urban ponds.** Ecological Applications. v. 21, n. 2, p. 378-390, 2011. <http://dx.doi.org/10.1890/10-0390.1>.

HANNAFORD, M.J, BARBOUR, M.T. & RESH, V.H. Training reduces observer variability in visual – based assessments of stream habitat. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 16, n. 4, p. 853-860, 1997.

HARRISON, S.; BRUNA, E. **Habitat fragmentation and large-scale conservation: what do we know for sure?** Ecography. v. 22, n. 3, p. 225-232, 1999. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0587.1999.tb00496.x>.

IUCN. **IUCN Red List of Treated Species.** www.iucnredlist.org – Ultimo acesso em 20 de out de 2022.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. **Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives.** New Phytologist. v. 204, n. 3, p. 459-473, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12989>.

JORDAN, M. A.; CASTAÑEDA, A. J.; SMILEY, P. C.; GILLESPIE, R. B.; SMITH, D. R.; KING, K. W. **Influence of instream habitat and water chemistry on amphibians in channelized agricultural headwater streams.** Agriculture, Ecosystems & Environment. v. 230, p. 87-97, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.028>.

KLEINSCHROTH, F.; HEALEY, J. R.; SIST, P.; MORTIER, F.; GOURLET-FLEURY, S. **How persistent are the impacts of logging roads on Central African forest vegetation?** Journal Of Applied Ecology, v. 53, n. 4, p. 1127-1137, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12661>.

KWET, A., LINGNAU, R.; DI-BERNARDO, M. **Anfíbios da serra gaúcha, Sul do Brasil.** Universität Tübingen. 2010.

MANEYRO R., & CARREIRA, S. **Guía de anfíbios del Uruguay.** Montevideo. 207p. 2012.

MARCILIO-SILVA, V.; MARQUES, M. C. M.; CAVENDER-BARES, J. **Land-use trade-offs between tree biodiversity and crop production in the Atlantic Forest.** Conservation Biology, v. 32, n. 5, p. 1074-1084, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/cobi.13138>.

MARTINAZZO, L. N. **História ambiental do Alto Uruguai:** colonização, desenvolvimento e transformações na paisagem. Lajeado, Centro Universitário UNIVATES, 2011.

MIKOLAICZIK, N. M.; BARRETO, M. S.; HARTMANN, M. T.; HARTMANN, P. A. **Bird fauna in secondary forest stages: a study in a southern brazilian protected area.** Oecologia Australis, v. 23, n. 2, 2019.

MILLER, D. A. W.; GRANT, E. H. C.; MUTHS, E.; AMBURGEY, S. M.; ADAMS, M. J.; JOSEPH, M. B.; WADDLE, J. H.; JOHNSON, P. T. J.; RYAN, M. E.; SCHMIDT, B. R.; CALHOUN, D. L.; DAVIS, C. L.; FISHER, R. N.; GREEN, D. M.; HOSSACK, B. R.;

RITTENHOUSE, T. A. G.; WALLS, S. C.; BAILEY, L. L.; CRUICKSHANK, S. S.; FELLERS, G. M.; GORMAN, T. A.; HAAS, C. A.; HUGHSON, W.; PILLIOD, D. S.; PRICE S. J.; RAY, A. M.; SADINSKI, W.; SAENZ, D.; BARICHIVICH, W. J.; BRAND, A.; BREHME, C. S.; DAGIT, R.; DELANEY, K. S.; GLORIOSO, B. M.; KATS, L. B.; KLEEMAN, P. M.; PEARL, C. A.; ROCHESTER, C. J.; RILEY, S. P. D.; ROTH, M.; SIGAFUS, B. H. **Quantifying climate sensitivity and climate change in North American amphibian communities.** *Nature Communications*, v. 9, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06157-6>.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; BUDKE, J. C.; JARENKOW, J. A.; EISENLOHR, P. V.; NEVES, D. R. **Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests.** *Journal of plant ecology*, v. 8, n. 3, p. 242-260, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. **Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate.** *Biotropica*, v. 32, p. 793-810, 2000.

PENDRILL, F.; PERSSON, U M.; GODAR, J.; KASTNER, T. **Deforestation displaced: trade in forest-risk commodities and the prospects for a global forest transition.** *Environmental Research Letters*, v. 14, n. 5, p. 055003, 2019. <http://dx.doi.org/10.1088/1748-9326/ab0d41>.

PLANO DE MANEJO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO RIO GRANDE DO SUL – RS. Prefeitura Municipal de Sertão (Secretaria Municipal de Agricultura e Desenvolvimento Econômico), 2015. Disponível em: <https://www.sertao.rs.gov.br/pagina/561/parque-natural-municipal-de-sertao>. Último acesso em: 07 set. 2021.

POTRICH, A. P.; SANTOS-PEREIRA, M.; TOFFOLO, C.; ASCOLI-MORRETE, T.; SOARES, J. P.; ZANELLA, N. **Anurans of a remnant of Mixed Rainforest in southern Brazil.** *Biota Neotropica*, v. 20, n. 4, p. 1-11, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2020-1091>.

PROJETO MAPBIOMAS – Coleção 7 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso da Terra do Brasil. Disponível em: <https://mapbiomas.org/estatisticas>. Último acesso em: 04 de out. de 2022.

ROONEY T. P., WIEGMANN S. M., ROGER D. A. & WALLER D. M. **Biotic impoverishment and homogenization in unfragmented forest understory communities.** *Conservation Biology*, v. 18, p. 787 – 798, 2004.

ROZENDAAL, D. M. A.; BONGERS, F.; AIDE, T. M.; ALVAREZ-DÁVILA, E.; ASCARRUNZ, N.; BALVANERA, P.; BECKNELL, J. M.; BENTOS, T. V.; BRANCALION, P. H. S.; CABRAL, G. A. L. **Biodiversity recovery of Neotropical secondary forests.** *Science Advances*, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2019. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aau3114>.

RStudio Team. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>. 2020.

SEGALLA, M. V., BERNECK, B., CANEDO, C., CARAMASCHI, U., CRUZ, C. A. G., GARCIA, P. C. A., GRANT, T., HADDAD, C. F. B., LOURENÇO, A. C. C., MÂNGIA, S., MOTT, T., NASCIMENTO, L. B., TOLEDO, L. F., WERNECK, F., LANGONE, J. A. **List of Brazilian Amphibians**. Herpetologia Brasileira, v. 10, n. 1, p. 121-216. 2010. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4716176>.

SLAVIERO, L. B.; BUDKE, J. C.; CANSIAN, R. L. As florestas do Parque Natural Municipal de Sertão. *In*: TEDESCO, C. D.; ZANELLA, N. (Org.). **Parque Natural Municipal de Sertão**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, p. 41-68, 2014.

SUÁREZ, R. P.; ZACCAGNINI, M. E.; BABBITT, K. J.; CALAMARI, N. C.; NATALE, G. S.; CEREZO, A.; CODUGNELLO, N.; BOCA, T.; DAMONTE, M. J.; VERA-CANDIOTI, J. **Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina**. Landscape Ecology, v. 31, n. 10, p. 2485-2505, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10980-016-0426-2>.

TUOMAINEN, U.; CANDOLIN, U. **Behavioural responses to human-induced environmental change**. Biological Reviews, v. 86, n. 3, p. 640-657, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185x.2010.00164.x>.

WELSH, H. H. JR.; OLLIVIER, L. M. **Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods**. Ecological Applications, v. 8, n. 4, 1998, p. 1118–32, 1998.

ZANELLA, N.; PAULA, A. de; GUARAGNI, S. A.; MACHADO, L. de S. **Herpetofauna do Parque Natural Municipal de Sertão, Rio Grande do Sul, Brasil**. Biota Neotropica, v. 13, n. 4, p. 290-298, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-06032013000400026>.

ANEXO I - Protocolo de Avaliação Rápida (PAR), modificado a partir do PAR proposto por Callisto et al. (2002), unindo com informações dos protocolos de Minatti-Ferreira; Beaumord (2006); Rodrigues; Castro (2008); Rodrigues et al., (2012). 0 a 40 pontos, trecho impactado; 41 a 60, trecho alterado; acima de 61 pontos, trecho natural.

Quadro 1 - Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats para trechos de bacias hidrográficas adaptado. 4 pontos (situação natural), 2 e 0 pontos (situações leve ou severamente alteradas).

PARÂMETRO	4	2	0
1. Tipo de ocupação das margens do corpo d'agua (principal atividade)	Vegetação natural	Campo de pastagem/ Agricultura/ Monocultura/ Reflorestamento	Residencial/ Comercial/ Industrial
2. Erosão próxima e/ou nas margens do rio e assoreamento em seu leito	Ausente	Moderada	Acentuada
3. Alterações antrópicas	Ausente	Alterações de origem doméstica (esgoto, lixo), alteração de uso agrícola	Alterações de origem industrial/ urbana
4. Cobertura vegetal no leito	Parcial	Total	Ausente
5. Odor da água	Nenhum	Total	Ausente
6. Oleosidade da água	Ausente	Moderada	Abundante
7. Transparência da água	Transparente	Turva/cor de chá forte (EM ALGUNS PONTOS)	Opaca ou colorida
8. Odor do sedimento	Nenhum	Esgoto (ovo podre)	Óleo/ Industrial
9. Oleosidade do fundo	Ausente	Moderado	Abundante
10.Tipo de fundo	Pedras de rio/cascalho	Pedra/Lama/areia	Cimento/canalizado

Quadro 2 - Protocolo de Avaliação Rápida da Diversidade de Habitats em trechos de bacias hidrográficas. Obs.: 5 pontos (situação natural), 3, 2 e 0 pontos (situações leve ou severamente alteradas).

PARÂMETRO	5	3	2	0
11. Substratos e/ou habitats disponíveis	Mais de 70% do trecho avaliado apresenta substratos favoráveis à colonização da epifauna e abrigo para insetos aquáticos, anfíbios ou peixes. Observa-se também uma mistura de galhos, seixos e outros habitats disponíveis.	De 50% a 70% do trecho avaliado apresenta substratos apropriados a colonização e manutenção da epifauna. Existem substratos adicionais aptos a colonização, como troncos sobre a água, mas que ainda não fazem parte do substrato do rio.	Entre 21% e 50% do trecho avaliado apresenta habitats estáveis mesclados, apropriados a colonização de espécies aquáticas.	A falta é óbvia ou mais de 80% do trecho avaliado apresenta habitats monótonos ou com pouca diversificação.
12. Regimes de velocidade/ profundidade	Rápidos e corredeiras bem desenvolvidas. Presença de 4 regimes: (1) rápido/raso, (2) rápido/profundo, (3) grande/raso e (4) pequeno/ profundo	Presença de 3 regimes, sendo obrigatória a presença do rápido/raso.	Presença de 2 regimes; se o regime rápido/raso ou lento/profundo estiver ausente a pontuação é menor.	Prevalência de apenas 1 regime geralmente lento/profundo.
13. Diversidade de poços	Proporções semelhantes entre os 4 tipos de poços: (1) grande/profundo, (2) pequeno/raso, (3) grande/raso e (4) pequeno/ profundo	Predomínio de poços grandes e profundos. Poucos poços rasos são observados.	Em geral há mais poços rasos que profundos.	Ausência de poços ou predomínio de apenas um tipo de poço, em geral pequenos e rasos.
14. Substrato de fundo	Mais de 60% do fundo é de cascalho, seixos rolados. Mistura quase heterogenia de classes de tamanho do substrato	De 30% a 60% do fundo é coberto por seixos rolados. Substrato pode ser dominado por estruturas de um só tamanho.	De 10% a 30% do fundo é composto por material de maior porte. Silte e areia representam de 70 a 90% do fundo	Substrato dominado por silte e areia. Cascalho e pedras de maior porte representam menos que 10% da cobertura.
16. Sinuosidade do canal	A ocorrência de curvas é evidente no trecho avaliado, proporcionando um aumento na diversidade de habitats para a biota local	A sinuosidade do canal não é tão evidente, podendo ser observadas curvas distantes e uma diversificação de habitats para a biota local	O trecho apresenta poucas curvas e os habitats são monótonos, havendo poucos locais para refúgio e reprodução da biota local	O trecho avaliado é retilíneo

<i>17. Alterações no canal do rio</i>	Canalização (retificação) ou dragagem ausente ou mínima; rio com padrão normal.	Alguma canalização presente, normalmente próximo a construção de pontes; evidências de modificações há mais de 20 anos.	Alguma modificação presente nas duas margens; 40 a 80% do rio modificado.	Margens modificadas; acima de 80% do rio modificado.
<i>18. Presença de mata ciliar</i>	Acima de 90% com vegetação ripária nativa, incluindo árvores, arbustos ou macrófitas; mínima evidência de deflorestamento; todas as plantas atingindo a altura “normal”.	Entre 70 e 90% com vegetação ripária nativa; deflorestamento evidente, mas não afetando o desenvolvimento da vegetação; maioria das plantas atingindo a altura “normal”.	Entre 50 e 70% com vegetação ripária nativa; deflorestamento óbvio; trechos com solo exposto ou vegetação eliminada; menos da metade das plantas atingindo a altura “normal”.	Menos de 50% da mata ciliar nativa; deflorestamento muito acentuada.
<i>19. Extensão de mata ciliar</i>	Largura da vegetação ripária maior que 18 m; sem influência de atividades antrópicas (agropecuária, estradas, etc.).	Largura da vegetação ripária entre 12 e 18 m; mínima influência antrópica.	Largura da vegetação ripária entre 6 e 12 m; influência antrópica intensa.	Largura da vegetação ripária menor que 6 m; vegetação restrita ou ausente devido à atividade antrópica.
<i>20. Cobertura vegetal</i>	Vegetação com várias alturas provendo uma mistura de sombras e luzes para a superfícies da água.	A vegetação descontinuada provê áreas de sombreamento alternadas com áreas de exposição completa.	O sombreamento é completo e denso.	Superfície da água é exposta totalmente a luz solar praticamente o dia todo
<i>21. Estado de conservação da vegetação de entorno</i>	A vegetação de entorno é composta por espécies nativas e apresenta bom estado de conservação; ou seja, não apresenta sinais de degradação por atividades humanas	A vegetação é composta por espécies nativas e exóticas, contudo está bem preservada. Mínima evidência de impactos causados por atividades	A vegetação presente é constituída por espécies exóticas e há pouca vegetação nativa. É possível perceber impactos de atividades humanas	A vegetação do entorno é praticamente inexistente e o solo está expostos a intempéries naturais. Atividades humanas como queimadas e desmatamento são evidentes.
<i>22. Estabilidade das margens</i>	Margens estáveis; evidência de erosão mínima ou ausente; pequeno potencial para problemas futuros. Menos de 5% da margem afetada.	Moderadamente estáveis; pequenas áreas de erosão freqüentes. Entre 5 e 30% da margem com erosão.	Moderadamente instável; entre 30 e 60% da margem com erosão. Risco elevado de erosão durante enchentes.	Instável; muitas áreas com erosão; freqüentes áreas descobertas nas curvas do rio; erosão óbvia entre 60 e 100% da margem.

<i>23. Presença de plantas aquáticas</i>	Pequenas macrófitas aquáticas e/ou musgos distribuídos pelo leito.	Macrófitas aquáticas ou algas filamentosas ou musgos distribuídas no rio, substrato com perifiton.	Algas filamentosas ou macrófitas em poucas pedras ou alguns remansos, perifiton abundante e biofilme.	Ausência de vegetação aquática no leito do rio ou grandes bancos macrófitas (p.ex. aguapé).
--	--	--	---	---