

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

CRISTINA BRIDI

**RESPOSTAS MORFOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E CELULARES DE
GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* EXPOSTOS A ÁGUA DO INTERIOR E
ENTORNO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO**

ERECHIM

2025

CRISTINA BRIDI

**RESPOSTAS MORFOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E CELULARES DE
GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* EXPOSTOS A ÁGUA DO INTERIOR E
ENTORNO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Hartmann

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann

ERECHIM

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bridi, Cristina
RESPOSTAS MORFOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E CELULARES
DE GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* EXPOSTOS A ÁGUA DO
INTERIOR E ENTORNO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE
SERTÃO. / Cristina Bridi. -- 2025.
50 f.:il.

Orientadora: Dra. Marília Hartmann
Co-orientador: Dr. Paulo Afonso Hartmann
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas, Erechim,RS, 2025.

1. anuros. 2. ecotoxicologia. 3. conservação. 4.
agrotóxicos. I. Hartmann, Marília, orient. II. Hartmann,
Paulo Afonso, co-orient. III. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IV. Título.

CRISTINA BRIDI

**RESPOSTAS MORFOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E CELULARES DE
GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* EXPOSTOS A ÁGUA DO INTERIOR E
ENTORNO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 13/06/2025.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann – UFFS
Coorientador

Prof.^a. Ms. Bruna Raquel Assmann – UNOCHAPECÓ
Avaliadora

Prof.^a. Dr.^a. Helen Treichel – UFFS
Avaliadora

Aos meus queridos pais, cujo amor e incentivo
sempre me guiaram pelos caminhos do mato,
dedico este trabalho com toda a gratidão do
meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Marília, que me acolheu e me amparou em momento de desespero e de insegurança, sempre disponível para conversas e orientações, sempre trouxe perspectivas novas ao meu trabalho. Além de orientadora, agradeço imensamente pela parte humana da prof. comigo, pelas demonstrações de carinho e de orgulho. Também agradeço ao meu coorientador, prof. Paulo, que abriu meus olhos sobre a pesquisa e que foi fundamental para que eu conseguisse concluir o projeto. Ademais, cabe a mim agradecer imensamente à prof. Magali, que me amparou muito com as análises de água, com muita delicadeza e paciência, também agradeço aos técnicos de laboratório, Suzana, Denis e Rafael por me ajudarem muito com as análises, reagentes e desespos. Agradeço também meus colegas de laboratório, especialmente à Flávia, Aline, Jenifer e Guilherme por estarem comigo e me ajudarem com o experimento. Sem vocês isso não teria acontecido, devo grande parte desse trabalho a vocês.

Agradeço a minha banca avaliadora pela disponibilidade de tempo e esforço para a melhoria da qualidade do meu trabalho.

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul e ao LABECO (Laboratório de Ecologia e Conservação) por me fornecerem estrutura e apoio durante esse período.

Agradeço aos meus pais, Adair e Eliana, que mesmo de longe, sempre se estiveram presentes nos momentos em que precisei e não mediram esforços para que meu trabalho e minha graduação desse certo. Vocês são minha maior inspiração e fazer vocês sentirem orgulho de mim foi, é e sempre será minha maior força motora. Agradeço aos demais membros da minha família, irmão Mateus, tia Lili, tio Vitor, vó Ondina, vô Ivo, que sempre me apoiaram e se interessam pela minha formação e deram conforto e inspiração para continuar a jornada.

Agradeço aos meus amigos, aqueles de longa data, que sempre fizeram questão de estarem presentes na minha vida e de me apoiarem no meu sonho, que envolveu esse trabalho e agradeço também aqueles que fiz no caminho da graduação, em especial Rubini e Zé, que foram meu apoio e que não me deixaram desistir, deixando todo o processo leve e divertido, eu não teria conseguido sem vocês meus queridos.

Agradeço ao meu namorado, Gabriel, que sempre me admirou pelo meu trabalho e me valorizou de todas as formas possíveis, além disso, me confortou e me deu carinho em os momentos, até quando nem eu sabia o quanto eu precisava do seu abraço. Seu apoio foi essencial para esse trabalho.

“As coisas seriam bem mais fáceis se a gente entendesse que não existe um modo certo de viver que nos torne imunes à tristeza. E que a tristeza é parte intrínseca do tecido da felicidade. Não dá para ter uma sem a outra. Obviamente, elas vêm em diferentes graus e doses. Mas não há uma vida sequer em que a pessoa possa existir num estado permanente de felicidade absoluta. E imaginar que existe uma vida assim só acrescenta mais infelicidade à nossa vida (Haig, 2021, p. 193) ”. “Não é consequência da Teoria de Darwin o fato de fazermos parte de algo maior, de um todo para o qual tudo é importante, até a menor forma de vida? Somos um planeta vivo, Sofia! Somos um grande barco navegando ao redor de um sol incandescente no universo. Mas cada um de nós é um barco em si mesmo, um barco carregado de genes navegando pela vida. Se conseguirmos levar esta carga ao porto mais próximo, nossa vida não terá sido em vão (Gaarder, 1991, p. 454) ”.

RESUMO

Os anfíbios são conhecidos por serem bioindicadores, devido a sua sensibilidade a impactos ambientais. Uma espécie que vem sendo estudada para entender a toxicidade de ambientes e perturbações é *Physalaemus cuvieri*, um pequeno sapo com ampla distribuição geográfica na América do Sul. O objetivo desse estudo foi avaliar respostas morfológicas, comportamentais e celulares de girinos de *P. cuvieri* expostos a águas de ambientes preservados do interior do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) e alterados no entorno agrícola. Coletaram-se amostras de água de dois charcos por ambiente, que foram levadas ao laboratório para análises físico-químicas e de agrotóxicos. As desovas de *P. cuvieri* foram coletadas na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), e criadas até o estágio 25 de Gosner. Foram montados microcosmos com a água e plantas dos charcos, pedras e 20 girinos cada, em triplicata. O ensaio durou 21 dias, com monitoramento periódico de pH, temperatura, oxigênio e amônia. Foram analisados os parâmetros de sobrevivência, medidos comprimento, massa, calculado índice de massa corporal e índice escalar de massa escalonada, realizados testes de comportamento e análises de anormalidades nucleares nos eritrócitos. Os parâmetros físico-químicos variaram pouco, exceto PA1, com maiores DBO e DQO, e PA2, com mais fósforo e nitrato. Nove agrotóxicos foram encontrados no entorno e cinco no interior, destacando-se o herbicida 2,4-D (maior no interior) e atrazina. Não houve mortalidade nem malformações nos girinos. No entanto, os girinos do interior apresentaram maiores massa, comprimento, BMI e SMI. No teste aversivo, os girinos do entorno permaneceram mais na zona de risco. No predatório, os girinos do entorno mostraram maior exploração da área, menor permanência nas bordas e maior tempo no centro, indicando percepção de risco alterada. Girinos do entorno tiveram mais anormalidades nucleares, como micronúcleos e núcleos lobados, entalhados e com broto. As águas do entorno causaram mais alterações, possivelmente relacionadas com a mistura de agrotóxicos. A mistura de poluentes intensifica os efeitos, mais do que compostos isolados. Mesmo águas do interior do PNMS apresentaram impactos, evidenciando que nem áreas protegidas estão livres de contaminação.

Palavras-chave: anuros, ecotoxicologia, conservação, agrotóxicos.

ABSTRACT

Amphibians are known to be bioindicators due to their sensitivity to environmental impacts. *Physalaemus cuvieri*, a small frog with wide geographical distribution in South America, has been studied to understand environmental toxicity and disturbances. The objective of this study was to evaluate morphological, behavioral, and cellular responses in *P. cuvieri* tadpoles exposed to waters from preserved environments within the Municipal Natural Park of Sertão (PNMS) and altered environments in the surrounding agricultural area. Water samples were collected from two ponds in each environment, transported to the laboratory, and analyzed for physical-chemical parameters and pesticides. *P. cuvieri* egg clutches were collected at Federal University of Fronteira Sul (UFFS) and reared until Gosner stage 25. Microcosms were set up with water and plants from the ponds, stones, and 20 tadpoles each, in triplicate. The assay lasted 21 days, with periodic monitoring of pH, temperature, oxygen, and ammonia. Survival parameters were analyzed; length and mass were measured; Body Mass Index (BMI) and Scaled Mass Index (SMI) were calculated; behavioral tests were conducted; and nuclear abnormalities in erythrocytes were assessed. Physical-chemical parameters varied little, except in PA1 (higher BOD and COD) and PA2 (more phosphorus and nitrate). Nine pesticides were detected in the surrounding area and five within the park, notably the herbicide 2,4-D (higher concentration inside) and atrazine. No mortality or malformations occurred in tadpoles. However, tadpoles from inside the park exhibited greater mass, length, BMI, and SMI. In the aversive test, tadpoles from the surrounding area spent more time in the risk zone. In the predation test, they showed greater exploration of the area, less time at the edges, and more time in the center, indicating altered risk perception. Tadpoles from the surrounding area also had more nuclear abnormalities—such as micronuclei and lobed, notched, and budded nuclei. Waters from the surrounding area caused more alterations, likely associated with pesticide mixtures. The mixture of pollutants intensified effects more than isolated compounds. Even waters from inside PNMS showed impacts, demonstrating that not even protected areas are free from contamination.

Keywords: anurans, ecotoxicology, conservation, pesticides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização do Parque Natural Municipal de Sertão (RS).	16
Figura 2. Microcosmos com água e plantas do Parque Natural Municipal de Sertão e entorno, utilizados no experimento com girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i>	19
Figura 3. Aparato para realização da simulação predatória de ave com girino em placa de Petri, exemplificando o movimento de estímulo, onde A) posição inicial e final (após a simulação) do aparato e B) posição da simulação de predação da ave.	21
Figura 4. Massa (g) e comprimento (mm) de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos a água de charcos do interior e entorno do Parque Natural Municipal de Sertão por 21 dias. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. (A) massa separada por grupo; B) comprimento dos girinos separados por grupo; C) massa dos girinos por ambiente; D) comprimento dos girinos por ambiente).....	26
Figura 5. Índices de BMI e SMI de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos a água de charcos do interior e entorno do Parque Natural Municipal de Sertão por 21 dias. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. (A) BMI separada por grupo; B) SMI separado por grupo; C) BMI separada por ambiente; D) SMI separado por ambiente)....	27
Figura 6. Porcentagem de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> permanentes na área estimulada no teste de estímulo aversivo após 21 dias de bioensaio. (A) grupos separados por poça; B) grupos separados por ambientes).....	28
Figura 7. Parâmetros do centro e distância avaliados no teste de simulação predatória. (A/B = Tempo no centro dos grupos (poça vs. ambiente); C/D= Latência para o centro dos grupos (poça vs. ambiente); E/F = Distância total dos grupos (poça vs. ambiente)).	29
Figura 8. Parâmetros da borda avaliados no teste de simulação predatória. (A/B = quantidade de cruzamento de linha (poça vs. ambiente); C/D= frequência de cruzamento de linha (poça vs. ambiente); E/F = tempo nas bordas (poça vs. ambiente); G/H = latência para as bodas (poça vs. ambiente)).	31
Figura 9. Batimento cardíaco por minuto (bpm) de <i>Physalaemus cuvieri</i> em diferentes condições após 21 dias de exposição. (A = bpm por grupos; B = bpm por ambiente).	32
Figura 10. Anomalias nucleares avaliadas de <i>Physalaemus cuvieri</i> dos charcos do interior e entorno do Parque Natural Municipal de Sertão. (A = núcleos binucleados; B = núcleos entalhados; C = núcleos com presença de broto; D = quantidade de núcleos lobados; E = quantidade de micronúcleos; F = quantidade total de anormalidades nucleares em eritrócitos).	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	MÉTODOS	15
3.1	ÁREA DE ESTUDO	15
3.2	ANÁLISE DE ÁGUA	16
3.3	ORGANISMO TESTE.....	18
3.4	MICROCOSMOS	18
3.5	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	20
3.5.1	Teste de estímulo aversivo	20
3.5.2	Teste de simulação predatória	20
3.6	ANÁLISE DE MALFORMAÇÕES	21
3.7	TAMANHO DO CORPO, ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (BMI) E ÍNDICE DE MASSA ESCALONADA (SMI)	21
3.8	FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	22
3.9	ANORMALIDADES NUCLEARES	22
3.10	ANÁLISE DE DADOS.....	22
4	RESULTADOS.....	23
4.1	ANÁLISES DE ÁGUA.....	23
4.2	ANÁLISES DOS GIRINOS DOS MICROCOSMOS.....	25
4.2.1	Tamanho do girino, BMI e SMI.....	25
4.2.2	Teste de estímulo aversivo	27
4.2.3	Teste de simulação predatória	28
4.2.4	Frequência cardíaca.....	32
4.2.5	Anomalias nucleares nos eritrócitos	32
5	DISCUSSÃO	35
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O grupo mais ameaçado de extinção dentre os vertebrados são os anfíbios, mas esse problema é multifacetado e inclui perda e fragmentação de habitat, principalmente para a agricultura (Luedtke *et al.*, 2023; IUCN, 2024), além de doenças e poluentes (Bahl *et al.*, 2024). A exposição a contaminantes é considerada uma das ameaças mais significativas aos anfíbios, afetando quase um quinto de todas as espécies (Bishop *et al.*, 2012), prejudicando o comportamento (Pavan *et al.*, 2021), a fisiologia (dos Santos *et al.*, 2024), causando malformações (Herek *et al.*, 2020) e alterações bioquímicas (Pompermaier *et al.*, 2024).

Nesse contexto, os anfíbios anuros são reconhecidos como excelentes bioindicadores ambientais, especialmente por serem extremamente sensíveis a degradações ambientais (Braga *et al.*, 2022) em virtude do ciclo de vida bifásico, pele e brânquias permeáveis (Peluso *et al.*, 2021b). As fases embrionárias e larvais da maioria dos anuros ocorrem em águas doces, sendo durante esse período que seu desenvolvimento somático e sexual se torna mais suscetível a distúrbios causados por contaminantes presentes na água (Orton, Tyler, 2015). Embriões e girinos podem apresentar mudanças comportamentais, de crescimento e desenvolvimento, bioquímicas e morfológicas em resposta à estresses vividos na sua fase de desenvolvimento (Ramadani *et al.*, 2022; Wingen *et al.*, 2023).

A utilização de organismos nativos em bioensaios têm ganhado destaque nos últimos anos (Bertrand, Iturburu, 2023) por refletir uma condição local ou regional, pela disponibilidade para coleta para experimentos e pela adaptação dos organismos às condições climáticas locais (Demetrio *et al.*, 2022). A escolha por anfíbios nativos como organismos modelos deve levar em conta fatores como: distribuição da espécie, diversidade de habitats ocupados, tamanho populacional e o status de conservação (Carvalho *et al.*, 2019). Dentro do grupo dos anfíbios, o gênero *Physalaemus* tem se destacado em bioensaios nos últimos anos, especialmente em pesquisas voltadas à ecologia e ao comportamento. Essa escolha se deve à ampla distribuição das espécies do gênero e à facilidade de manutenção em laboratório, o que favorece a análise detalhada de suas respostas a diferentes estímulos ambientais (Curi *et al.*, 2019; Samojeden *et al.*, 2022; Macagnan *et al.*, 2023).

Muitas espécies de anfíbios anuros, como *P. cuvieri*, apresentam um ciclo de vida bifásico complexo, e estão expostas a diferentes ameaças ao longo de sua vida, principalmente porque os estágios embrionário e larval estão confinados a ambientes aquáticos (Nolan *et al.*, 2023). Essa espécie é afetada por viver ambientes antrópicos, onde é exposta a contaminantes como pesticidas, e metais pesados, que afetam sua sobrevivência, morfologia corporal, tamanho

corporal, saúde imunológica, núcleos de eritrócitos e comportamento (Silva *et al.*, 2021; de Alburquerque *et al.*, 2024; dos Santos *et al.*, 2024). Ameaças antropogênicas em ambientes aquáticos que podem agravar o problema de sobrevivência de embriões e larvas (Goessens *et al.* 2022; Nolan *et al.*, 2023).

Esses organismos têm como habitat as águas doces, que embora representem apenas cerca de 1% da superfície terrestre, sustentam aproximadamente 12% de todas as espécies do planeta, incluindo um terço dos vertebrados (Garcia-Moreno *et al.*, 2014; Pekel *et al.*, 2016). A biodiversidade e os serviços ecossistêmicos das águas doces estão em risco, onde quase uma em cada três espécies de água doce está ameaçada de extinção (Higgins *et al.*, 2021). As principais ameaças à biodiversidade de água doce incluem as alterações climáticas, a degradação e fragmentação dos habitats, a poluição, a homogeneização do regime de fluxo por barragens, introdução de espécies não nativas, a captação de água para a indústria ou irrigação e a superexploração das populações naturais (Carpenter *et al.*, 2011; Dudgeon, 2019; Albert *et al.*, 2020).

A qualidade das águas é frequentemente degradada pelo uso intensivo das terras, incluindo a agricultura que aumenta as cargas de sedimentos, fertilizantes e agrotóxicos em águas subterrâneas e superficiais (Peñuelas, Sardans, 2022). As águas superficiais, que desempenham o papel de ecossistemas receptores, estão sujeitas a receber diversos contaminantes, podendo participar dos processos de transformação desses poluentes ou atuar como fontes difusas, contribuindo para sua dispersão no meio ambiente (Stehle *et al.*, 2018).

A degradação dos ecossistemas de água doce está intrinsecamente ligada à degradação e fragmentação de habitats terrestres, como observado na Mata Atlântica (Reid *et al.*, 2018). A redução da cobertura florestal não apenas ameaça espécies terrestres, mas também compromete a integridade de rios, nascentes e zonas úmidas, que dependem da vegetação ripária para manutenção da qualidade da água e regulação do fluxo hídrico (Grill *et al.*, 2019). A conversão de florestas em áreas agrícolas ou urbanas intensifica a poluição por sedimentos e agroquímicos, agravando o declínio da biodiversidade aquática já pressionada por barragens e espécies invasoras (Stehle, Schulz, 2015; Galán-Acedo *et al.*, 2023). O monitoramento da qualidade dessas águas e da saúde ambiental dos ambientes em que estão presentes se faz imprescindível à sua preservação efetiva (Mkandawire *et al.*, 2014).

Entre as florestas tropicais e subtropicais do mundo, a Mata Atlântica destaca-se como uma das mais intensamente fragmentadas (Haddad *et al.*, 2015). A Mata Atlântica tem sido alvo de intervenções humanas desde os primórdios da história brasileira e, atualmente, sua fragmentação é alarmante: aproximadamente 80% dos fragmentos florestais possuem menos de

50 hectares (Ribeiro *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2025). Nas últimas décadas diversas áreas de proteção ambiental foram criadas com o intuito de proteger ‘hotspots’ de biodiversidade, assim como a Mata Atlântica (Gray *et al.*, 2016). No entanto, apenas 9% dos remanescentes de Mata Atlântica estão dentro de áreas de proteção integral e, em sua maioria, sofre influências antrópicas, como rodovias, indústrias e principalmente áreas agrícolas (Rezende *et al.*, 2018).

O Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) está localizado no município de Sertão, no noroeste do Rio Grande do Sul, dentro do bioma Mata Atlântica e foi criado pelo Decreto Municipal n 027/1998 (SEMA, 2018). Ele é categorizado como Unidade de Conservação de Proteção Integral, onde é admitido apenas o uso indireto dos recursos naturais. Por ser um parque municipal, sua gestão é competência da Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Sertão (Sertão, 2015). O parque sofre pressão humana nas redondezas pela expansão da agricultura, especialmente de culturas de soja, milho e trigo (Slaviero *et al.*, 2014).

As áreas protegidas, como o Parque Natural Municipal de Sertão, contribuem para a proteção dos corpos hídricos. Sem essa proteção as águas podem ser afetadas pela ocorrência de contaminantes químicos, com impactos negativos na flora e a fauna aquática e na estrutura e funcionamento do ecossistema (Schäfer *et al.*, 2012; Beketov *et al.*, 2013). Os principais contaminantes encontrados em corpos aquáticos são de agrotóxicos e metais pesados, derivados da agricultura e pecuária (Khoshnood, 2017). Os metais pesados presentes em corpos d’água podem causar estresse oxidativo, inflamação, dano histológico e mutações genéticas em organismos aquáticos (Qian *et al.*, 2020). Os agrotóxicos representam uma preocupação maior ao meio ambiente por causarem mudanças drásticas nos sistemas fisiológicos dos animais aquáticos que entram em contato com essas substâncias (López-Pacheco *et al.*, 2019).

A partir dessa perspectiva, torna-se essencial investigar como diferentes tipos de ambientes – aqueles protegidos legalmente e destinados à preservação, bem como áreas alteradas devido ao uso humano intensivo, como as zonas agrícolas – afetam a biologia e o comportamento dos girinos durante seu desenvolvimento. Avaliar esses efeitos permite entender como esses organismos respondem a pressões ambientais distintas, fornecendo e aprofundando conhecimento sobre o impacto do decréscimo da qualidade da água e da poluição.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas morfológicas, comportamentais e celulares de girinos expostos a água do interior (ambientes preservados) e do entorno (ambientes antropicamente alterados) do Parque Natural Municipal de Sertão.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os padrões físico-químicos da água de charcos do interior e entorno do PNMS,
- Avaliar a presença e concentração de agrotóxicos nas águas de charcos do interior e entorno do PNMS,
- Analisar a sobrevivência dos girinos mantidos em microcosmos com água de charcos do interior e entorno do PNMS,
- Avaliar o comportamento exploratório e anti-predatório dos girinos expostos a água de charcos do interior e entorno do PNMS,
- Observar malformações morfológicas dos girinos expostos a água de charcos do interior e entorno do PNMS,
- Comparar a frequência cardíaca dos girinos expostos a água dos dois ambientes
- Verificar ocorrência de anormalidades nucleares nos eritrócitos de girinos expostos a água dos dois ambientes.

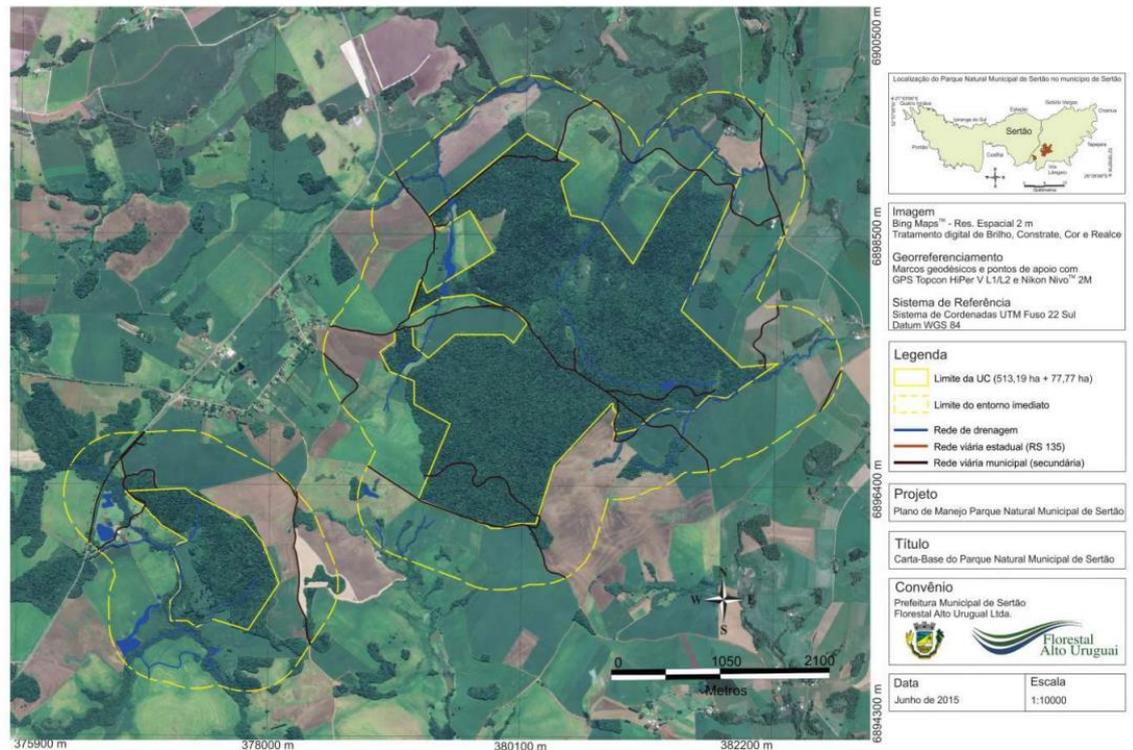
3 MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Foi utilizado com área referência para o estudo o Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS) e no seu entorno, localizado no município de Sertão, no norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 1). O Parque tem área de 590,88 hectares e está dentro do bioma Mata Atlântica, com a vegetação predominante sendo de Floresta Ombrófila Mista (Sertão, 2015). É uma Unidade de Conservação de proteção integral e dessa forma, possui objetivo primordial de conservação dos recursos naturais (Brasil, 2000).

Para coleta de água foram selecionados charcos no interior do Parque e no seu entorno, considerando a presença dos charcos e acesso possível. Os charcos selecionados apresentavam as seguintes características: poças permanentes ou semipermanentes, rasas e com água parada e/ou estagnada. Foi coletada água de dois charcos no interior do Parque, considerado ambiente preservado (PC1 – Poça Conservada 1 - e PC2 – Poça Conservada 2), e dois no entorno, em ambientes agrícolas, considerados ambientes alterados (PA1 – Poça Alterada 1 - e PA2 – Poça Alterada 2). A seleção de dois charcos e dois ambientes levou em conta o acesso desses corpos de água na área estudada. Em cada um dos charcos selecionados foram coletados 15 litros de água em recipientes plásticos e mais 2,5 litros em vidro âmbar. A água foi coletada uma única vez, em novembro de 2024. Também foram coletadas plantas de cada charco e acondicionadas em sacos plásticos identificados para serem utilizadas como enriquecimento ambiental e se aproximar da condição a qual os animais se desenvolveriam se estivessem na natureza. O volume de água maior (15 litros) foi utilizado para estruturação dos microcosmos e o volume menor foi destinado para as análises de água.

Figura 1. Localização do Parque Natural Municipal de Sertão (RS).



Fonte: Sertão, 2015.

3.2 ANÁLISE DE ÁGUA

As análises das águas coletadas seguiram dois métodos: (1) a análise de água no local de coleta, por meio da sonda multiparâmetro *YSI Professional Plus* e (2) análises laboratoriais. Em laboratório a água foi processada e avaliada de acordo as metodologias presentes na literatura, seguindo os manuais de análise da água, *Standard methods for the examination of water and wastewater, Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* e o Manual da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (AOAC, 2000; APHA; AWWA *et al.*, 2012; FUNASA, 2013).

Os parâmetros físico-químicos analisados no projeto foram: oxigênio dissolvido (OD), potencial hidrogeniônico (pH), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), nitrato, fósforo total, alcalinidade, cloretos e dureza. A metodologia aplicada para análise de DBO envolve a incubação das amostras diluídas em frascos específicos a 20°C por 5 dias. Após esse período, foi medido a diferença entre os teores iniciais e finais de oxigênio dissolvido. O pH foi determinado com a utilização do aparelho pHmetro e o oxigênio dissolvido por oxímetro. Para a análise de DQO foi utilizado dicromato de potássio em meio ácido para oxidar a matéria orgânica da amostra, onde a quantidade de dicromato consumido é proporcional à carga orgânica total, é feita por titulação. O nitrato total foi determinado com a

absorção de luz ultravioleta pelo íon nitrato a 220nm. A análise de fósforo envolveu a digestão da amostra para converter todas as formas de fósforo em ostofosfato, seguido de reação com molibdato de amônio e ácido ascórbico, formando um complexo azul quantificado por espectrofotometria. A alcalinidade foi mensurada medindo a capacidade da água de neutralizar ácidos, por meio de titulação com ácido sulfúrico 0,02N até atingir um pH específico. Os cloretos foram analisados baseados na titulação de íons de cloro com a solução padrão de nitrato de prata, utilizando cromato de potássio como indicador. A dureza foi mensurada com kit rápido de análise de água.

As análises referentes a quantificação de agrotóxicos presente nas amostras foram realizadas no LARPS (UFSM) e seguiu o método desenvolvido por Prates (2024), que incluiu a utilização cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série após o preparo de amostras por extração em fase sólida, com limite de quantificação para a maioria dos compostos de 0,02 µg L⁻¹. Foram considerados para análise os compostos que apresentavam viabilidade analítica: Alacloro, Ametina, Atrazina, Carbaril, Carbendazim, Carbofurano, Ciproconazol, Clorpirifós oxon, Desetilatrazina, Diflubenzuron, Dimetoato, Diuron, Epoxiconazol, Etoxisulfuron, Fentiona, Fipronil, Flutriafol, Hidroxiatrazina, Imazetapir, Imidacloprido, Indoxacarbe, Malationa, Metalaxil, Metidationa, Metolacloro, Molinato, Picoxistrobina, Profenofós, Protioconazol destio, Simazina, Tebuconazol, Tetraconazol, Tiametoxam, Tiodicarbe, Triciclazol, Clorimurom etílico, Cresoxim metílico, Metsulfuron metílico, 2,4-D, Aldicarbe, Desisopropilatrazina, Diazinona e Terbufós.

3.3 ORGANISMO TESTE

Desovas de *Physalaemus cuvieri* com menos de 24 horas de oviposição foram coletadas em uma lagoa da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – Campus Erechim em um local não agricultável (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste), sob licença ICMBio 92512-2. Os animais foram criados em água destilada em aquários de vidro com capacidade de 10 litros até o estágio 25 de acordo com Gosner (1960), com fotoperíodo 12-12 claro/escuro. A fase 25 de desenvolvimento corresponde a fase que o girino está com todo o corpo formado e tem natação livre fora do ovo. Os girinos foram alimentados com ração para peixes da marca *Alcon basic*, que possui como principais componentes farinha de peixe, farelo de soja e creme de milho.

3.4 MICROCOSMOS

Nesse estudo utilizamos a denominação microcosmos para o experimento laboratorial, onde foi mantido o padrão de replicação ambiental, contendo água e plantas dos charcos. Eles foram compostos por bacias transparentes de plástico com capacidade de 13 litros, alocadas no Laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS – Campus Erechim. A montagem foi feita com 4 litros de água dos charcos em cada bacia e a densidades iguais de plantas do mesmo local de coleta em cada bacia. A água de cada um dos charcos foi colocada em três bacias, formando uma triplicata, cada bacia com água do charco foi nomeada como o nome do grupo e o número da triplicata (por exemplo: PC1/1, PC1/2, PC1/3). Também foram adicionadas pedras nos microcosmos para ancorar as plantas e servirem de refúgio para os girinos e como enriquecimento ambiental. As bacias foram mantidas com aeradores para manter os níveis de oxigênio das águas. A temperatura e a luminosidade tiveram controle natural. O ensaio durou 21 dias e não houve troca de água ou reposição nesse período (Figura 2).

Figura 2. Microcosmos com água e plantas do Parque Natural Municipal de Sertão e entorno, utilizados no experimento com girinos de *Physalaemus cuvieri*.



Fonte: Cristina Bridi, 2024.

Foram colocados 20 girinos em cada microcosmos, em triplicata, totalizando 60 indivíduos por charco de coleta. A sobrevivência dos indivíduos foi avaliada diariamente. Foi verificado a cada três dias a qualidade da água medindo a temperatura, amônia, pH e oxigênio dissolvido de cada microcosmo. As análises de amônia e pH foram feitas com kits rápidos de teste de qualidade da água, enquanto a temperatura e oxigênio dissolvido foram analisados pelo oxímetro. Não foi feita nenhuma intervenção acerca dos valores observados pelas análises. O experimento foi conduzido sob CEUA nº 1283171224.

3.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

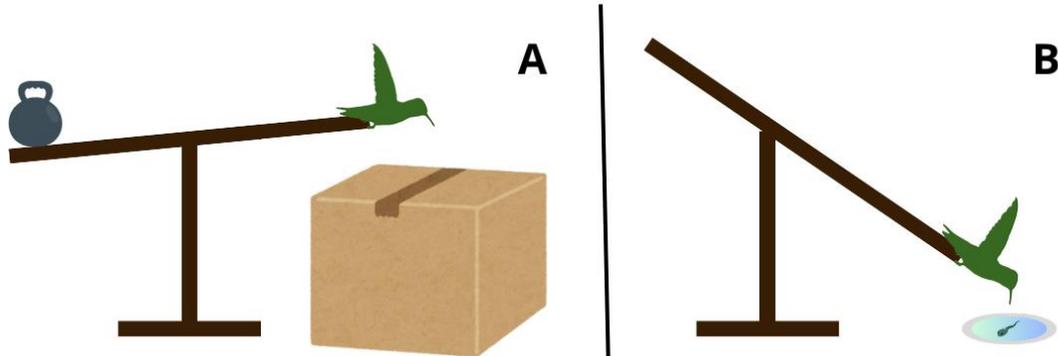
3.5.1 Teste de estímulo aversivo

No 20º dia de ensaio foi realizado o teste comportamental de estímulo aversivo, para verificar a percepção de risco dos animais. Para esse teste, cinco girinos de cada grupo foram colocados em uma placa de Petri com 6 cm de diâmetro, contendo 15 ml de água destilada, em triplicata (três placas de Petri filmadas de cada vez). As placas foram posicionadas sobre monitores de LCD de notebooks, e deixadas por um período de adaptação de 5 minutos em descanso, antes da exibição de um estímulo visual representando um predador (um predador para cada placa). Esse estímulo de predação foi apresentado por 5 minutos, e, ao final, foi registrado o número de girinos que permaneceram dentro e fora da área de estímulo, sendo dentro considerado área de risco (adaptado de Pompermaier *et al.*, 2022). Foram filmados 45 girinos de cada grupo durante todo o período de teste (10 minutos) com câmera de celular.

3.5.2 Teste de simulação predatória

No 21º dia foi feito o teste de simulação predatória (adaptado de Pompermaier *et al.* 2020), utilizando um modelo de ave como exemplo de predador. Para isso, foi criado um aparato (Figura 2) de madeira que possuía um mecanismo similar à uma gangorra, e com a ave presa à uma extremidade e um peso a outra. Abaixo da ave foi colocada uma placa de Petri de 15,5 cm de diâmetro com 200 ml de água destilada, onde o girino foi inserido e deixado por 5 minutos sem nenhum estímulo, para adaptação ao novo local. Após os 5 minutos, foi liberado o movimento padronizado da ave tocando a película de água e rapidamente saindo, e após esse estímulo, o girino ficou mais 5 minutos no teste, sem novos estímulos. Foram feitos 10 testes por grupo, onde os girinos participavam exclusivamente desse teste comportamental, ou seja, não foram os mesmos girinos do teste de estímulo aversivo. Os testes duraram 10 minutos cada no total, a partir do início do estímulo com a ave e foram inteiramente gravados em câmera de celular de 48mp e analisados pelo software EthoVision XT, com os parâmetros: distância percorrida, quantidade de vezes que o girino entrou na área de risco de ataque (centro da placa), frequência de entrada na borda, o tempo permanecido nas bordas, a latências para as bordas e para o centro e o tempo permanecido no centro, depois do estímulo. Esses parâmetros permitiram a avaliação da mudança - ou não – do indivíduo em relação ao perigo de um ataque de um predador. Os girinos utilizados no teste não foram utilizados em outro teste de comportamento.

Figura 3. Aparato para realização da simulação predatória de ave com girino em placa de Petri, exemplificando o movimento de estímulo, onde A) posição inicial e final (após a simulação) do aparato e B) posição da simulação de predação da ave.



Fonte: Cristina Bridi, 2025.

3.6 ANÁLISE DE MALFORMAÇÕES

A análise de malformações morfológicas foi realizada com 10 girinos de cada grupo, por observação em estereomicroscópio. As definições de malformações morfológicas seguiram a análise dos parâmetros: (1) intestino, analisando se as alças intestinais estavam ou não em formato espiral (2) boca, se apresentava ou não queratodontes e mandíbulas superiores e inferiores, (3) coluna, se estava na posição reta ou se havia desvio de ângulo, (4) hemorragia, onde era observado se existiam sangramento em alguma das regiões do corpo e (5) olhos, se possuíam coloração preta uniforme ou variações.

3.7 TAMANHO DO CORPO, ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (BMI) E ÍNDICE DE MASSA ESCALONADA (SMI)

Ao final do experimento 15 girinos foram retirados aleatoriamente de cada grupo (PC1, PC2, PA1 e PA2) e foram pesados com balança analítica e medidos com paquímetro eletrônico. Os dados foram utilizados para análise do tamanho do corpo (comprimento e massa) e o cálculo dos índices BMI (Índice de Massa Corporal) e SMI (Índice de Massa Escalonada), para avaliar a condição do corpo relacionando a massa com o comprimento (Peig, Green, 2009). O BMI foi calculado dividindo a massa (g) pelo quadrado do comprimento total (mm) e o SMI por um expoente de escala (bs) foi determinado através de uma análise de regressão linear dos dados transformados em logaritmo, onde $\log(\text{comprimento})$ foi plotado no eixo X e $\log(\text{massa})$ no eixo Y. A inclinação da linha de regressão resultante forneceu o expoente de escala. O

comprimento médio da população amostrada foi utilizado como comprimento padrão (L0). Dessa forma, a fórmula de SMI é: $SMI = M_i \times (L_0/L_i)^3$, onde M_i corresponde a massa do indivíduo e L_i o comprimento.

3.8 FREQUÊNCIA CARDÍACA

No último dia do experimento foi verificado o batimento cardíaco de 10 indivíduos por grupo (PC1, PC2, PA1 e PA2), onde cada girino foi colocado na posição ventral no estereomicroscópio e sua atividade cardíaca foi monitorada durante 60 segundos (Pompermaier *et al.*, 2024).

3.9 ANORMALIDADES NUCLEARES

Para avaliar a presença de anormalidades nucleares nos eritrócitos, foram preparadas lâminas de sangue periférico. Os indivíduos foram eutanasiados de acordo com as diretrizes éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Brasil, 2018), utilizando lidocaína a 5%. As amostras de sangue (0,5 ml) foram coletadas de 10 girinos de cada grupo, retirados aleatoriamente. Após isso, foi realizado o esfregaço em lâminas de microscopia, seguidas de secagem por 12 horas e depois coradas com o kit Panótico rápido para hematologia (Laborclin, Brasil). Foram contadas 1000 células por girino e as análises de anomalias nucleares constituíram em (1) micronúcleo, constituído por um núcleo menor separado do núcleo principal, (2) células em apoptose, onde o núcleo está em processo de morte celular, (3) células binucleadas, que apresentavam dois núcleos de tamanhos iguais, (4) células anucleadas, onde não havia a presença de núcleo, (5) cariólise, apenas o contorno do núcleo está presente, com cor desbotada e sem material genético visível, (6) núcleos lobados, onde os núcleos apresentavam lóbulos e protruções de formato irregular, (7) núcleos entalhados, que apresentam uma saliência em forma de fenda e (8) núcleo com broto, onde há formação de uma protrusão que permanece conectada ao núcleo principal (dos Santos *et al.*, 2024).

3.10 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism utilizando o teste ANOVA One-Way, seguido do post hoc de Dunnet (para dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste pós-hoc de Dunn (para dados não paramétricos). Nas análises comparativas entre os dois ambientes foi utilizado teste T de student para determinar se houve uma diferença significativa entre as médias. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES DE ÁGUA

Os parâmetros físico-químicos das águas coletadas nos diferentes charcos do PNMS apresentaram poucas diferenças (Tabela 1). O charco PA1 obteve um valor maior de DBO e DQO quando comparado a água dos outros locais. Em PA2 a água apresentou valores mais baixos de cloretos e mais elevados de fósforo e de nitrato. Nos microcosmos alguns parâmetros da água mudaram. Os valores de pH e temperatura se alteraram naturalmente e ficaram homogêneos e a amônia diminuiu. O aumento do oxigênio dissolvido foi devido aeração constante da água. A amônia manteve-se estável nos grupos PC1, PC2 e PA2, mas aumentou no laboratório para PA1 e, em menor grau, para PA2.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos avaliados das águas dos charcos coletadas das áreas do interior do Parque Natural Municipal de Sertão (PC1 e PC2) e entorno (PA1 e PA2). Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Amb. = valor do parâmetro da água analisada no ambiente coletado. Lab. = valor no controle laboratorial da água presente nos microcosmos durante o experimento.

Parâmetros	Interior		Entorno	
	PC1	PC2	PA1	PA2
DBO (mg/L)	1,40	1,30	3,90	1,60
Cloretos (mg/L)	2,25	0,75	0,75	0,50
Alcalinidade mineral (mg/L)	5,93	4,37	4,33	5,23
DQO (mg/L)	17,0	15,5	22,0	18,5
Dureza (mg/L)	50	50	50	50
Fósforo (mg/L)	0,016	0,020	0,022	0,051
Nitrato (mg/L)	1,09	0,40	0,50	6,34
pH amb.	8,41	7,80	7,25	6,90
pH lab.	6,81	6,71	7,03	7,16
Oxigênio dissolvido amb (mg/L)	4,5	4,2	3,2	7,0
Oxigênio dissolvido lab (mg/L)	6,3	6,1	6,3	5,9

Tabela 1. Continuação.

Parâmetros	Interior		Entorno	
	PC1	PC2	PA1	PA2
Temperatura (°C) amb.	19,0	23,5	26,9	19,1
Temperatura (°C) lab.	24,3	24,6	24,2	24,3
Amônia (ppm) amb.	0,08	0,08	2,00	0,08
Amônia (ppm) lab.	0,05	0,14	1,06	0,19

Fonte: Cristina Bridi, 2025.

Nos charcos do interior do PNMS foram detectados cinco diferentes tipos de agrotóxicos, enquanto na água do entorno foram detectados nove (Tabela 2). As maiores concentrações em todas as áreas foram de herbicidas (2,4-D, atrazina e seu metabólito, hidroxiatrazina) e fungicidas (tebuconazol). O agrotóxico 2,4-D apareceu em concentrações mais altas no interior do Parque do que nas áreas agrícolas do entorno. A atrazina e hidroxiatrazina estavam presentes em todas as áreas, mas em concentrações baixas; a hidroxiatrazina foi detectada em quantidades maiores em PA1 (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de agrotóxicos ($\mu\text{g/L}$) presentes nas amostras de água coletada das áreas do Parque Natural Municipal de Sertão (PC1 e PC2) e de seu entorno (PA1 e PA2). Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Compostos	Interior		Entorno	
	PC1	PC2	PA1	PA2
2,4-D	6,675	6,630	0,228	5,522
Ametrina	n.d	n.d	<LOQ	n.d
Atrazina	<LOQ	0,046	0,050	0,020
Carbendazim	n.d	<LOQ	0,023	<LOQ
Diuron	n.d	n.d	<LOQ	n.d
Fipronil	0,022	0,039	n.d	0,065
Hidroxiatrazina*	<LOQ	0,031	0,367	0,027
Metacloro	n.d	n.d	<LOQ	n.d
Protioconazol-destio	n.d	n.d	<LOQ	n.d
Tebuconazol	0,020	0,026	0,084	0,020

Fonte: Cristina Bridi, 2025. < LOQ (Limite de quantificação do método = $0,02\mu\text{g}$) = o composto está presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método. n.d = não detectado. * metabólito da atrazina.

4.2 ANÁLISES DOS GIRINOS DOS MICROCOSMOS

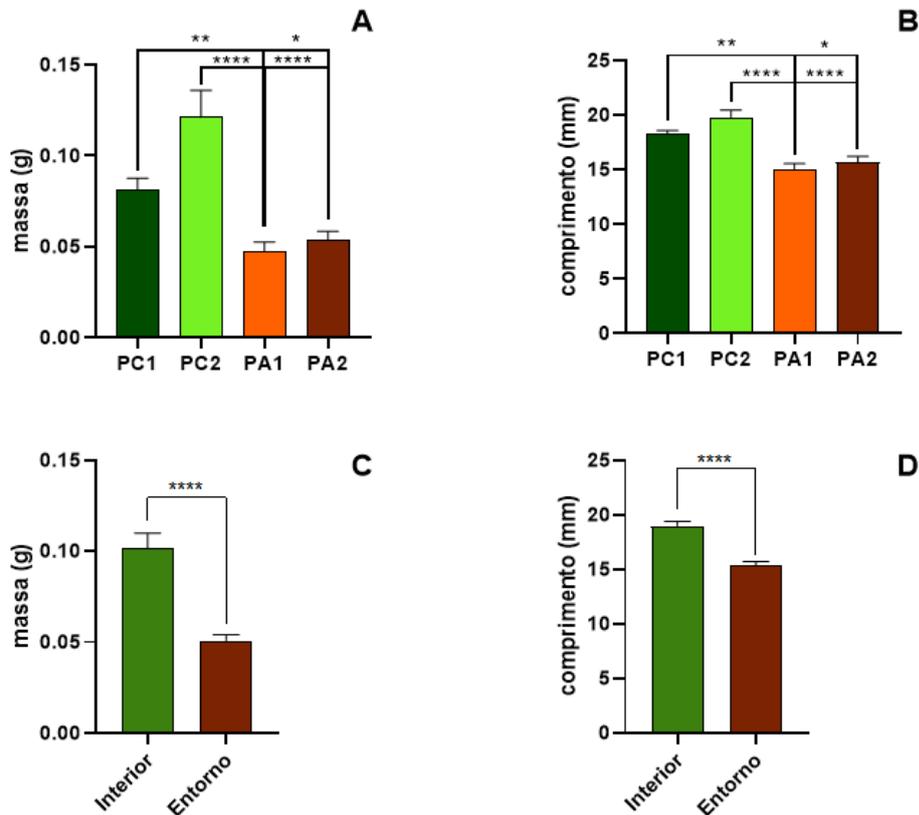
Não foi registrado mortalidade dentre os girinos dos grupos, dessa forma a sobrevivência de todos os grupos foi de 100%. Além disso, não foi observada nenhuma malformação morfológica nos girinos do ensaio.

4.2.1 Tamanho do girino, BMI e SMI

Os girinos do grupo PC1 e PC2 apresentaram maior comprimento do corpo ($F_{(4, 60)} = 14,41$; $p < 0,0001$; Fig. 4A) e maior massa ($H_{(4, 60)} = 33,19$; $p < 0,0001$; Fig. 4B) do que dos grupos PA1 e PA2. Quando os dados foram reunidos por ambiente (interior vs. entorno do PNMS), foi possível identificar maior comprimento ($t_{(58)} = 6,197$; $p < 0,0001$; Fig. 4C) e massa ($t_{(58)} = 5,414$; $p < 0,0001$; Fig. 4D) dos girinos expostos a água dos charcos do interior do PNMS em relação aos girinos da água dos charcos do entorno.

Figura 4. Massa (g) e comprimento (mm) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a água de charcos do interior e entorno do Parque Natural Municipal de Sertão por 21 dias.

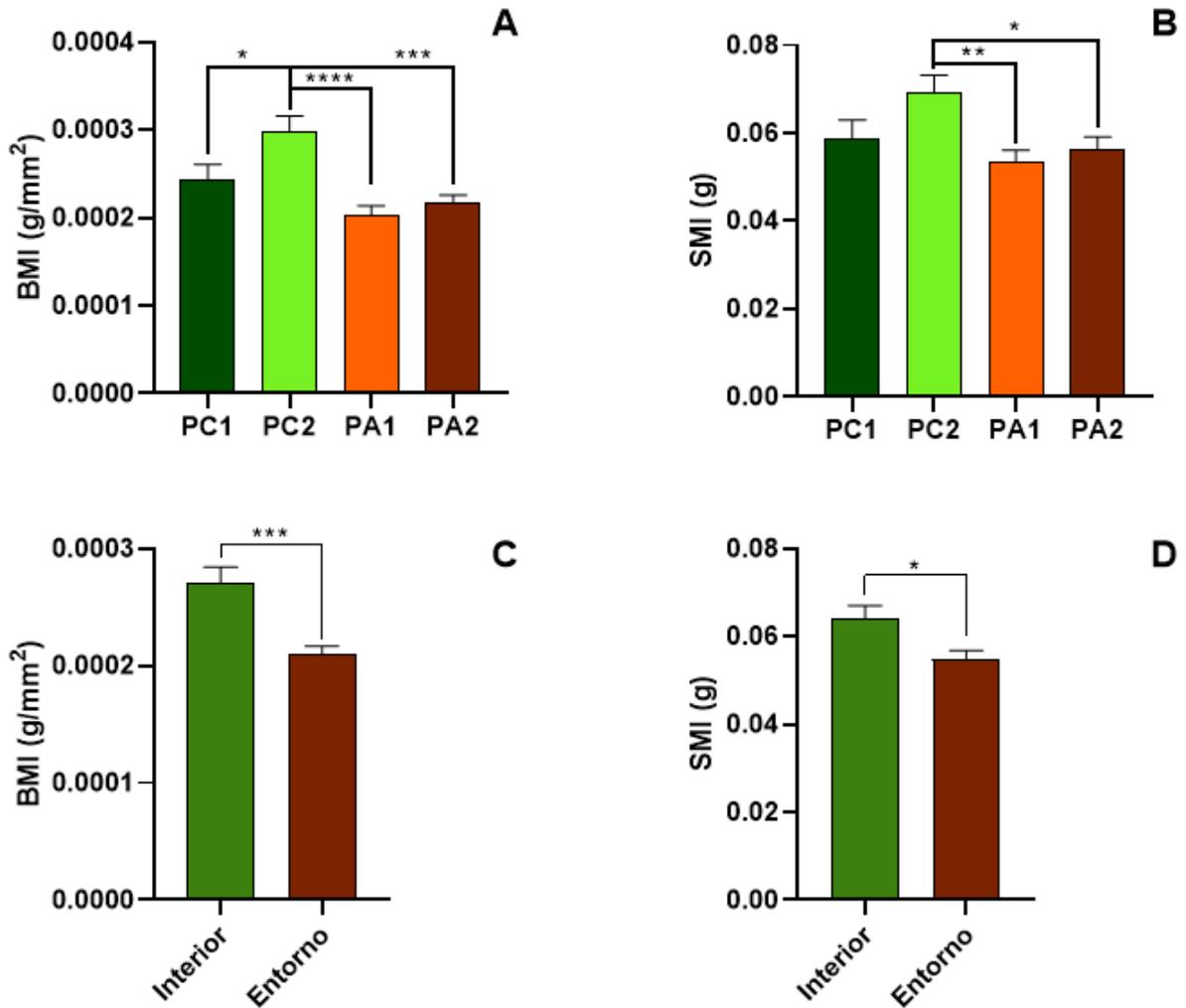
Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. (A) massa separada por grupo; B) comprimento dos girinos separados por grupo; C) massa dos girinos por ambiente; D) comprimento dos girinos por ambiente).



Fonte: Cristina Bridi, 2025.

Os girinos expostos a água de PC2 apresentaram maior BMI (Fig 5A; $F_{(4,60)} = 8,755$; $p < 0,0001$) e SMI (Fig 5B; $F_{(4,60)} = 4,108$; $p = 0,0105$) que os outros grupos. Quando os dados foram reunidos por ambiente, os girinos expostos a água do interior do PNMS apresentaram BMI (Fig 5C; $t_{(58)} = 4,107$; $p < 0,0001$) e SMI (Fig 5D; $t_{(58)} = 2,604$; $p = 0,0117$) maiores que os do entorno.

Figura 5. Índices de BMI e SMI de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a água de charcos do interior e entorno do Parque Natural Municipal de Sertão por 21 dias. Município de Sertão, norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. (A) BMI separada por grupo; B) SMI separado por grupo; C) BMI separada por ambiente; D) SMI separado por ambiente).

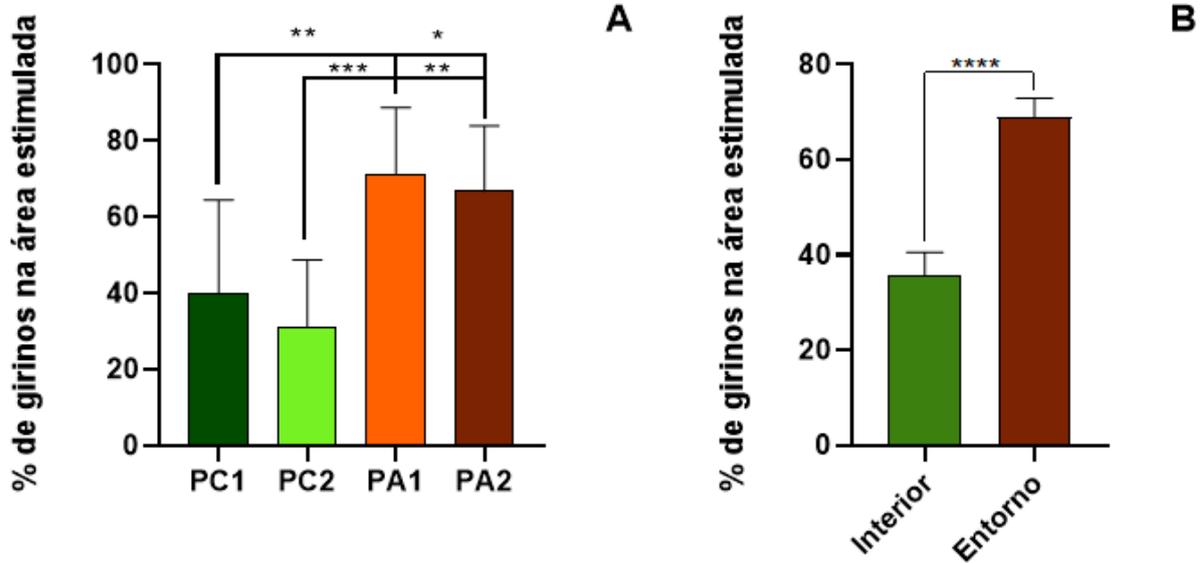


Fonte: Cristina Bridi, 2025.

4.2.2 Teste de estímulo aversivo

O teste indicou que os girinos de PA1 e PA2 permaneceram na área estimulada pelo predador em maior quantidade que os girinos dos grupos PC1 e PC2 ($F_{(4,36)} = 9,148$; $p = 0,0002$), como pode ser observado na Figura 6A. Ao examinar as informações dos girinos reunidos por ambiente, a diferença foi mais evidente, mostrando que girinos na água do entorno do PNMS ficaram na zona de risco de predação em maior proporção em comparação com aqueles do interior do PNMS ($t_{(34)} = 5,190$; $p < 0,0001$; Fig 6B).

Figura 6. Porcentagem de girinos de *Physalaemus cuvieri* permanentes na área estimulada no teste de estímulo aversivo após 21 dias de bioensaio. (A) grupos separados por poça; B) grupos separados por ambientes).

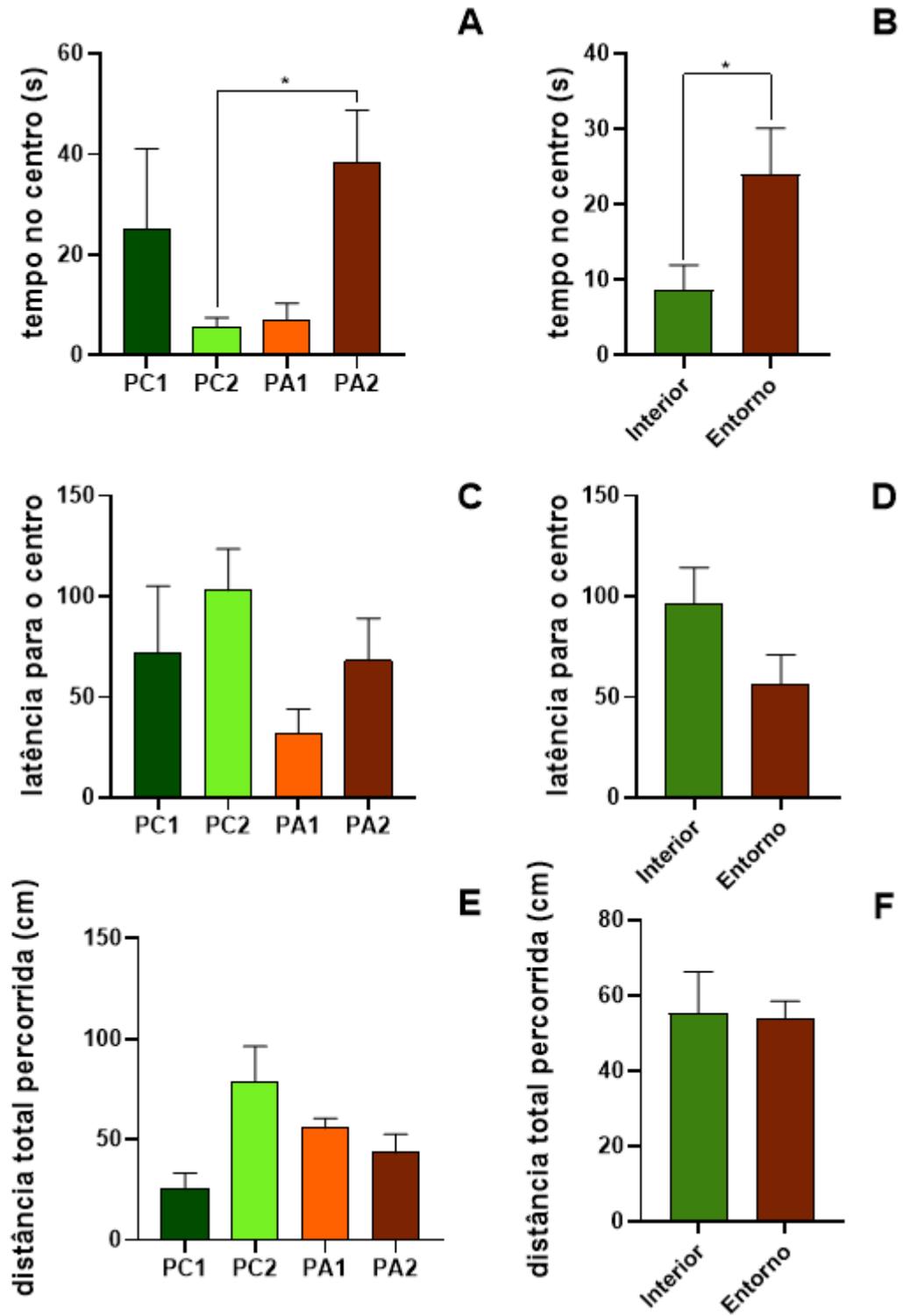


Fonte: Cristina Bridi, 2025.

4.2.3 Teste de simulação predatória

Os girinos do grupo PA2 passaram mais tempo no centro da área (Fig 7A), que possui o maior risco de ataque, em comparação aos do grupo PC2 ($H_{(4,102)} = 8,435$; $p = 0,0378$). O mesmo ocorreu quando os grupos foram unificados por ambiente, onde os girinos do entorno do PNMS ficaram mais tempo na área central (Fig 7B; $t_{(78)} = 2,173$; $p = 0,0321$).

Figura 7. Parâmetros do centro e distância avaliados no teste de simulação predatória. (A/B = Tempo no centro dos grupos (poça vs. ambiente); C/D= Latência para o centro dos grupos (poça vs. ambiente); E/F = Distância total dos grupos (poça vs. ambiente)).



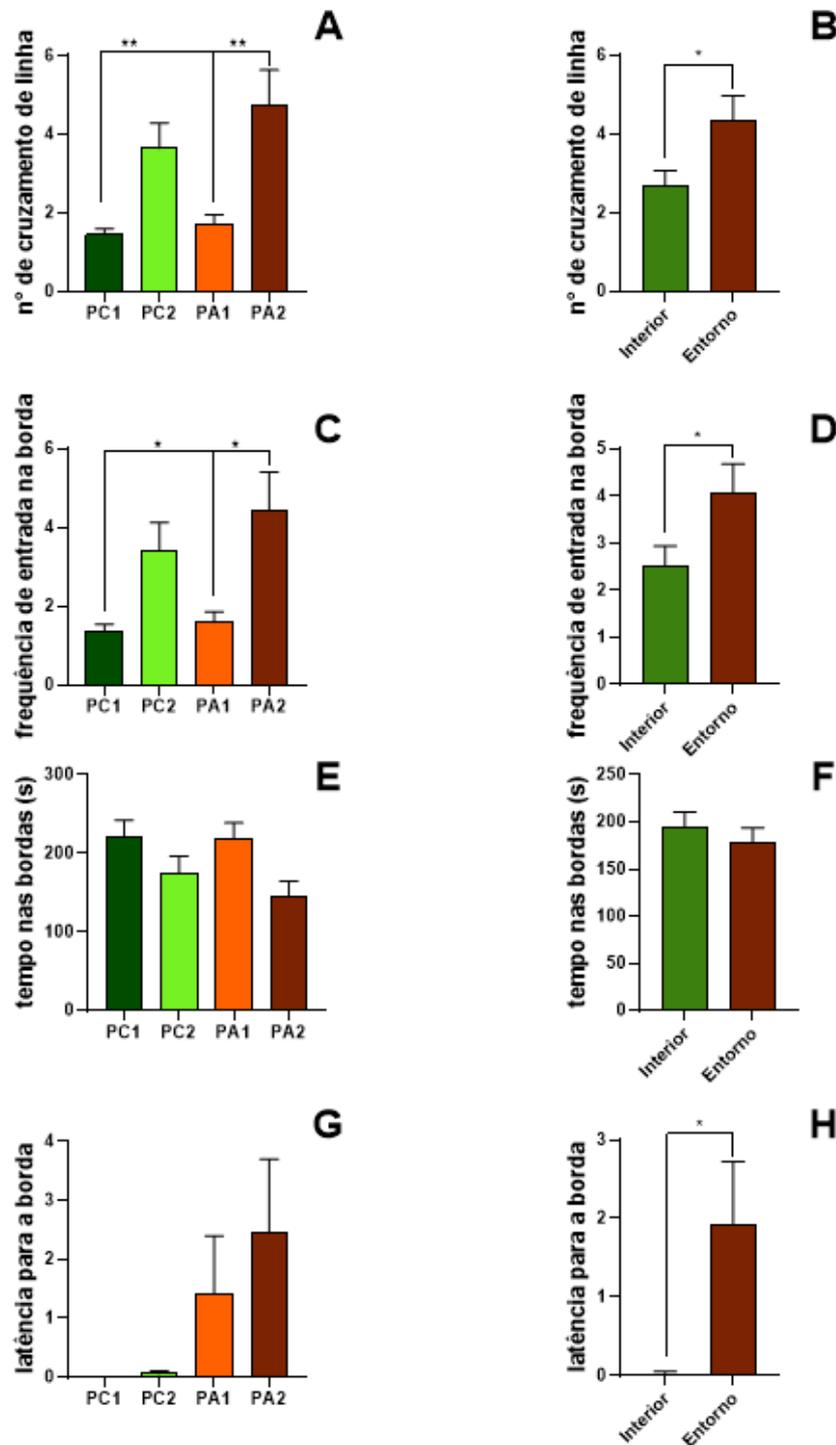
Fonte: Cristina Bridi, 2025.

Os girinos do grupo PA2 obtiveram uma maior quantidade de cruzamento de linhas em relação aos grupos PA1 e PC1 ($H_{(4,102)} = 13,90$; $p = 0,0030$; Fig 8A). Em consequência disso, a frequência de entrada na borda (Fig 8C) foi maior dos girinos do grupo PA2 comparado aos dos grupos PA1 e PC1 ($F_{(4,102)} = 4,726$; $p = 0,004$). A latência para as bordas (Fig 8E) não mostrou diferença entre os girinos dos grupos por via de incapacidade do *software*, entretanto é possível observar a maior latência nos grupos PA1 e PA2 em relação aos girinos dos grupos PC1 e PC2.

Os dados por ambiente demonstraram que os girinos dos charcos do entorno do PNMS cruzaram mais linhas em relação aos do interior PC ($t_{(100)} = 2,216$; $p = 0,0289$; Fig 8B), tiveram maior frequência de entrada na borda ($t_{(100)} = 2,099$; $p = 0,0383$; Fig 8D) e maior latência para as bordas (Fig 8H; $t_{(78)} = 2,403$; $p = 0,0186$).

A distância total percorrida (Fig 7E; $H_{(4,264)} = 6,165$; $p = 0,1038$), tempo nas bordas (Fig 8E; $F_{(4,102)} = 3,007$; $p = 0,0340$) e latência para o centro (Fig 7D; $F_{(4,44)} = 1,624$; $p = 0,1190$) não apresentaram diferença significativa entre os grupos e nem entre os ambientes (Fig 7F; $t_{(262)} = 0,1310$; $p = 0,8959$; Fig 8F; $t_{(100)} = 0,7471$; $p = 0,4568$; Fig 7E; $t_{(42)} = 1,774$; $p = 0,0834$).

Figura 8. Parâmetros da borda avaliados no teste de simulação predatória. (A/B = quantidade de cruzamento de linha (poça vs. ambiente); C/D= frequência de cruzamento de linha (poça vs. ambiente); E/F = tempo nas bordas (poça vs. ambiente); G/H = latência para as bordas (poça vs. ambiente)).

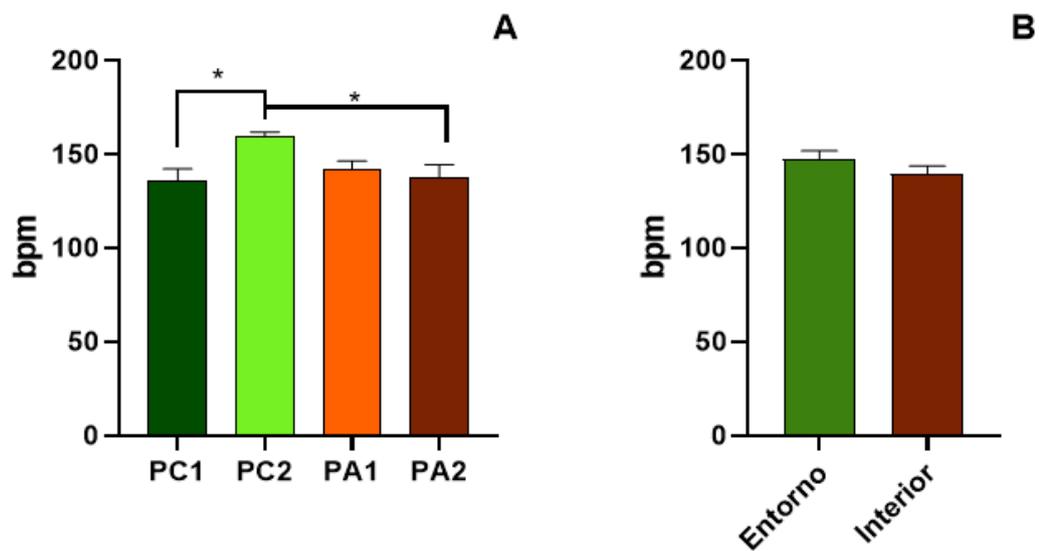


Fonte: Cristina Bridi, 2025.

4.2.4 Frequência cardíaca

O batimento cardíaco diminuiu nos girinos dos grupos PC1 e PA2 comparado a PC2 ($H_{(4,40)} = 9,883$; $p = 0,0196$), conforme observado na Figura 9A. Quando a análise foi por ambiente, o batimento cardíaco não foi diferente nos girinos ($t_{(38)} = 1,316$; $p = 0,1961$; Fig 9B).

Figura 9. Batimento cardíaco por minuto (bpm) de *Physalaemus cuvieri* em diferentes condições após 21 dias de exposição. (A = bpm por grupos; B = bpm por ambiente).



Fonte: Cristina Bridi, 2025.

4.2.5 Anomalias nucleares nos eritrócitos

Dos oito tipos de ANEs avaliadas foram encontradas cinco nos girinos dos microcosmos e apenas a frequência de células binucleadas não mostrou diferença entre os grupos (Tabela 3). Núcleos entalhados ($H_{(4,40)} = 23,56$; $p < 0,0001$) e lobados ($F_{(4,40)} = 29,12$; $p < 0,0001$) foram significativamente encontrados em PC1, PA1 e PA2, mas foram mais frequentes em PAs; núcleos com brotos foram mais registrados nos grupos PA1 e PA2 ($F_{(4,37)} = 18,04$; $p < 0,0001$), e micronúcleos foram significativos nesses mesmos dois grupos ($H_{(4,30)} = 14,67$; $p = 0,0021$).

Tabela 3. Anormalidades nucleares encontradas em eritrócitos de *Physalaemus cuvieri* após 21 dias expostos à água de charcos do interior do Parque Natural Municipal de Sertão e de seu entorno.

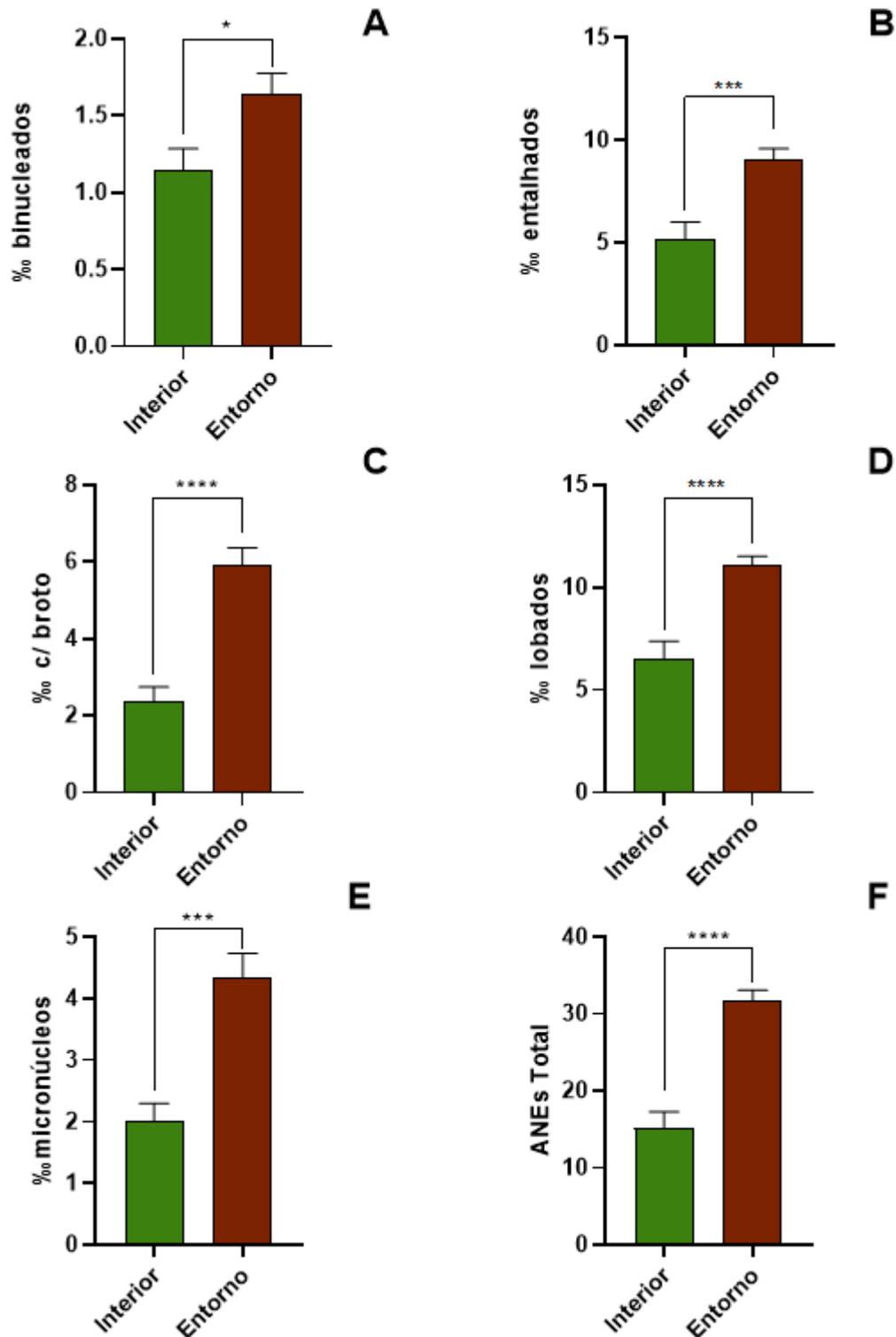
ANEs	Interior		Entorno	
	PC1	PC2	PA1	PA2
Binucleado	1 ± 0,58 (0-2)	1 ± 0 (0-1)	2 ± 0,53 (0-2)	2 ± 0,48 (0-2)
Entalhado	7,5 ± 2,80 (4-13)**	2 ± 0,67 (0-3)	8,5 ± 2,31 (5-13)**	10 ± 2,49 (5 – 13)****
Broto	2 ± 2,02 (0-7)****	2 ± 0,70 (0-3)**	4,5 ± 1,76 (2-7)****	7,5 ± 1,72 (5-9)***
Lobado	9,5 ± 2,90 (6-15)****	3 ± 1,15 (2-5)	10,5 ± 2,49 (7-12)****	11,5 ± 1,71 (8-13)****
Micronúcleo	2 ± 0,89 (0-4)	1 ± 0,54 (0-2)	4 ± 1,03 (3-5)*	5 ± 2,13 (1-9)**

Fonte: Cristina Bridi, 2025. Os dados representam a média ± desvio padrão (mínimo- máximo).

Asteriscos (*) indicam significância entre os grupos.

Ao analisar os dados por ambiente, foi observado que girinos na água do entorno apresentaram mais ANEs. Houve um aumento da frequência de núcleos binucleados ($t_{(19)} = 2,333$; $p = 0,0308$; Fig 10A), entalhados ($t_{(38)} = 3,977$; $p = 0,0003$; Fig 10B), com broto ($t_{(35)} = 5,674$; $p < 0,0001$; Fig 10C), lobados ($t_{(38)} = 4,562$; $p < 0,001$; Fig 10D), de micronúcleos ($t_{(28)} = 3,996$; $p = 0,0004$; Fig 10E) e num geral do número total de ANE ($t_{(38)} = 6,608$; $p < 0,0001$; Fig 10F).

Figura 10. Anomalias nucleares avaliadas de *Physalaemus cuvieri* dos charcos do interior e entorno do Parque Natural Municipal de Sertão. (A = núcleos binucleados; B = núcleos entalhados; C = núcleos com presença de broto; D = quantidade de núcleos lobados; E = quantidade de micronúcleos; F = quantidade total de anormalidades nucleares em eritrócitos).



Fonte: Cristina Bridi, 2025.

5 DISCUSSÃO

As diferenças na Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) representa o quanto de oxigênio é preciso para que os microorganismos consigam decompor a matéria orgânica da água (Kuznietsov, Biedunkova, 2024). Nesse caso, os maiores valores de DBO em PA1, indicam uma carga de matéria orgânica mais alta, que indica menores valores de oxigênio dissolvido. Da mesma forma, a água dos charcos no entorno do PNMS, principalmente PA1, apresentaram valor mais alto de DQO do que as outras amostras de água. A Demanda Química de Oxigênio (DQO) fornece uma medida de oxigênio que equivale a porção da matéria orgânica na água que é suscetível à oxidação sob as condições do teste (Seferlis, 2008; Abdullahi *et al.*, 2021). Assim como a DBO, quanto maior o valor de DQO, menor é qualidade da água, ao indicar alta carga potencialmente poluidora (Wang *et al.*, 2021), que podem ter relação direta com o uso de fertilizantes nos sistemas agrícolas no entorno do PNMS (Cui *et al.*, 2020). As águas dos charcos do entorno também apresentaram mais fósforo e nitrato. O fósforo é um macronutriente limitante para as plantas, dessa forma, está presente em altas quantidades em fertilizantes agrícolas (Liu *et al.*, 2021) e pode contribuir para a eutrofização de corpos d'água por escoamento e infiltração (McDowell, Nash, 2012). O nitrato pode ter origem de fertilizantes químicos (Zhang *et al.*, 2021) e pode causar eutrofização, floração de algas tóxicas e hypoxia (Hoagland *et al.*, 2019). No entanto, a Resolução CONAMA nº 357 (Brasil, 2005) considera aceitável até 10mg/L de nitrato em águas doces, dessa forma, o charco PA2, que apresentava um valor mais elevado (6,34 mg/L), ainda está dentro dos padrões ambientais.

A amônia pode ter efeito tóxico em girinos, com aumento da mortalidade, especialmente em embriões (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2010; Dimitrova, Lukanov, 2024). Entretanto, outros estudos, como de Zambrano-Fernández *et al.* (2022) demonstra que a amônia reduziu a sobrevivência apenas durante a primeira semana de vida dos girinos, permanecendo estável após esse período. Os padrões de amônia se modificaram nos microcosmos, no entanto os níveis não afetaram a sobrevivência, já que não houve mortalidade durante o ensaio. É possível que tenha relação com a fase de desenvolvimento 25 de Gosner (1960), onde o indivíduo já é um girino completo.

A detecção de agrotóxicos nos charcos é preocupante. As águas dos charcos no entorno mostraram mais tipos de agrotóxicos que no interior. No entanto o herbicida 2,4-D apresentou maior concentração nos charcos de interior. O agrotóxico 2,4-D possui efeitos negativos no crescimento, comportamento, sobrevivência e saúde nuclear de girinos, incluindo o gênero *Physalaemus* (Viriato *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2022; dos Santos *et al.*, 2024). A atrazina, e

seus metabólitos, que foram encontrados nos charcos do interior e do entorno do PNMS, pode induzir a hiperatividade e comprometer a percepção de predadores dos girinos (Ehram *et al.*, 2016; Ikari *et al.*, 2024), além de aumentar a taxa de mortalidade e alterar parâmetros fisiológicos (Rohr, 2021).

Os agrotóxicos conseguem chegar nesses ecossistemas aquáticos por escoamento agrícola, deposição atmosféricas, erosão do solo, lixiviação, esgoto industrial e doméstico e infiltração no solo (Kaushik *et al.*, 2010). Outros estudos, como de Braga *et al.* (2022) e Bagnolo *et al.* (in press), também detectaram agrotóxicos em águas de áreas protegidas, mas em quantidades inferiores às detectadas em nosso estudo, possivelmente pelo fato de terem sido analisadas águas correntes, e não de poças, que podem concentrar esses agrotóxicos e conseqüentemente potencializando os efeitos negativos causados por esses compostos. Os lugares mais afetados pela aplicação de agrotóxicos são sistemas aquáticos de água doce rasos e até mesmo poças que são frequentemente associadas a áreas agrícolas, que são habitats comuns para anfíbios (Solomon *et al.*, 2008; Peluso *et al.*, 2021a).

Nos microcosmos com água do entorno do PNMS os girinos atingiram menor comprimento, massa, BMI e SMI, indicando uma pior condição fisiológica, que pode comprometer a metamorfose e forma adulta desses animais (e.g. Nolan, *et al.*, 2025). A presença de herbicidas pode exigir uma maior alocação de energia do girino, provavelmente com o objetivo de sustentar mecanismos de biotransformação e manutenção da homeostase, que pode trazer prejuízos de investimento energético no crescimento e desenvolvimento (Wingen *et al.*, 2023).

Os girinos que foram expostos à água dos charcos do entorno tiveram alterações comportamentais, com os dois testes mostrando o mesmo resultado: girinos mais sucessíveis à predadores, não reconhecendo o risco e nem reagindo ao predador (e.g. Pompermaier *et al.*, 2022), implicando que a condição da água alterou as percepções de perigo desses girinos. No teste de simulação predatória, os girinos da água do entorno do PNMS ficaram mais tempo na área central, que era uma área de perigo. Esses animais também estavam mais agitados, e saíram e entraram mais vezes da área central, onde ocorria o ataque do predador. Isso também foi visto pela latência para a área segura, que era maior para esses girinos, indicando que eles demoravam a perceber que estavam em área de risco. A não percepção de predadores, e de perigos em geral, pode interferir na dinâmica populacional da espécie, especialmente em áreas contaminadas com pesticidas (Jefferson *et al.*, 2013; Pompermaier *et al.*, 2022). O comportamento comum antipredação de girinos não é necessariamente de fuga, mas sim de permanecer imóveis em área segura (Gazzola *et al.*, 2018). Este padrão foi observado nos

girinos que foram expostos a água do interior do PNMS, que após a simulação do predador, permaneceram nas bordas, onde era uma área segura.

A água do entorno do PNMS pode ser considerada genotóxica para girinos de *P. cuvieri* pela frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares nos eritrócitos. Estudos recentes indicam que a presença de micronúcleos, que indicam dano de DNA acumulado durante a vida da célula (Bhuyan *et al.*, 2020), são uma consequência da exposição a agrotóxicos (Borges *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2019; Herek *et al.*, 2020). A mistura complexa de oito agrotóxicos na água do entorno do PNMS pode ter induzido a formação de ANEs. Além disso, outras anormalidades foram observadas em número maior nos eritrócitos dos girinos da água de áreas agrícolas, como núcleos entalhados, que podem ser um investimento para eliminar danos genéticos em situações de estresse ou exposição química (Shimizu *et al.*, 2000; Herek *et al.*, 2020). Os núcleos binucleados são formados quando a divisão celular é interrompida (Pollo *et al.*, 2015), esse encerramento pode ter origem da toxicidade de pesticidas, como a atrazina (Lopes *et al.*, 2025), que estava presente nas águas do entorno do PNMS. A alta presença de núcleos lobados que foi observado nos girinos da área do entorno do PNMS, pode representar um meio de curto prazo para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio do sangue desses girinos (Dwyer *et al.*, 1992) e segundo Çavas e Ergene-Goçukara (2005) pode ser um indicativo de dano genotóxico. Os núcleos que apresentaram broto foram mais presentes também no sangue dos girinos do entorno do PNMS, e essa anormalidade pode conter informações genéticas sobre oncogenes, que podem levar à formação de células cancerosas (Ossa-López *et al.*, 2017).

Quando analisamos os grupos separados, PA1 e PA2 apresentaram maiores alterações. Em PA1 ocorreram maior DBO, DQO e oito tipos de agrotóxicos na água, menor massa, BMI e SMI baixos, mais girinos na área estimulada, menor latência para o centro. Em PA2, mais fósforo e nitrato, cinco tipos de agrotóxicos na água, baixa massa e comprimento e BMI e SMI, maior número de girinos permanentes na área estimulada, maior tempo na área de risco de predação, maior quantidade de cruzamento de linhas e frequência de entrada na borda, maior latência para a borda, mais ANEs, com alta frequência de micronúcleos, núcleos lobados, entalhados e com broto. Ambas causaram efeitos, portanto o número de tipos de agrotóxicos não é determinante, mas provavelmente a mistura sim. O coquetel de substâncias tóxicas como agroquímicos podem exceder fortemente o efeito dos agrotóxicos isolados (Jutta *et al.*, 2016; Cairo *et al.*, 2024). Estudos como de Peluso *et al.* (2023) mostram que a mistura de pesticidas, juntamente com outros contaminantes, em corpos de água causa efeitos letais e sub-letais em girinos.

Mesmo que tenha menor alterações do que entorno, os girinos que ficaram expostos à água do interior do PNMS ainda sofrem com a presença de ANEs como núcleos entalhados, binucleados, com broto, lobados e micronúcleos. Além disso, girinos expostos à água de PC1 tiveram sua percepção de risco levemente alterado, ficando em números consideráveis na área estimulada no teste de estímulo aversivo e também passaram mais tempo no centro no teste de simulação predatória, onde a área central representava risco de predação. Dessa maneira, a água do entorno causou mais efeitos, mas a do interior não foi isenta – também apresentou efeitos nos girinos expostos.

Esse estudo é o primeiro estudo que foi capaz de comprovar a influência da água de charco do interior e entorno de uma área de conservação sobre a morfologia, fisiologia, anormalidades celulares e comportamento, especialmente anti-predatório, em girinos de *P. cuvieri*. Os diferentes tipos de agrotóxicos em mistura encontrados no interior e principalmente no entorno do parque indica que podem ter sido a principal causa dos efeitos encontrados, e corrobora com os estudos sobre os efeitos dessas substâncias em girinos e anfíbios em geral. Os resultados aqui são importantes principalmente por analisar os efeitos da água com contaminantes nas suas concentrações ambientais encontradas, sem inserir ou retirar os mesmos, e dessa forma, ajudar a compreender os fenômenos que ocorrem na natureza e os riscos que esses animais sofrem cotidianamente em áreas agrícolas e até mesmo em áreas protegidas legalmente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os charcos do entorno do Parque Natural Municipal de Sertão exibem concentrações mais elevadas de contaminantes agrícolas — agrotóxicos e seus metabólitos — em comparação aos charcos localizados em seu interior. Ainda assim, mesmo nos charcos do interior, onde se esperaria menor influência antrópica, foram detectados resíduos desses mesmos compostos, indicando que a deriva aérea, a escorrência superficial e o transporte subterrâneo de agroquímicos podem estar ultrapassando os limites das áreas de cultivo. Esses resultados sugerem que as águas da região estão sujeitas ao impacto difuso de agrotóxicos, o que pode comprometer a qualidade da água, a diversidade biológica e as funções ecológicas dos habitats aquáticos.

A condição da água alterou os parâmetros fisiológicos e comportamentais dos girinos, indicando que, os agrotóxicos e parâmetros físico-químicos nos charcos no entorno do PNMS possuem componentes e propriedades capazes de afetar as populações de anfíbios, especialmente de girinos em fase de desenvolvimento, o que é alarmante considerando a situação atual desse grupo. A presença de agrotóxicos em áreas protegidas é motivo de grande preocupação, pois compromete os objetivos fundamentais dessas regiões, que visam à conservação da biodiversidade. Tais compostos representam riscos significativos à fauna local, afetando especialmente organismos mais sensíveis, como os girinos, que acabam expostos a níveis de ameaça incompatíveis com o grau de proteção esperado.

Esse estudo corrobora com a metodologia de microcosmos, mostrando que eles podem ser fundamentais para avaliar os efeitos de componentes ambientais — neste estudo, a qualidade da água — sobre organismos aquáticos, como os girinos. Essa abordagem metodológica permite identificar parâmetros ambientais críticos que influenciam diretamente o desenvolvimento, a sobrevivência e o bem-estar dos indivíduos. Ademais, recomenda-se um estudo mais longo, que avalie essas mudanças até a metamorfose dos indivíduos para verificar a influência da água na transformação do girino em indivíduo adulto, verificando se enquanto adulto ele ainda está suscetível à alterações morfológicas e comportamentais em virtude do seu local de criação.

REFERÊNCIAS

- Abdullahi, A. B., Siregar, A. R., Pakiding, W., & Mahyuddin. (2021). The analysis of BOD (Biological Oxygen Demand) and COD (Chemical Oxygen Demand) contents in the water of around laying chicken farm. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 788(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012155>
- Albert, J. S., Destouni, G., Duke-Sylvester, S. M., Magurran, A. E., Oberdorff, T., Reis, R. E., Winemiller, K. O., & Ripple, W. J. (2020). Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio*, 50(1). <https://doi.org/10.1007/s13280-020-01318-8>
- Amaral, S., Metzger, J. P., Rosa, M., Adorno, B. V., Gonçalves, G. C., & Guedes Pinto, L. F. (2025). Alarming patterns of mature forest loss in the Brazilian Atlantic Forest. *Nature Sustainability*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41893-025-01508-w>
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation (WEF). (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater (22nd ed.).
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2000). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). AOAC International.
- Bahl, M. F., Salgado Costa, C., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Arruti, M. E., Brodeur, J. M. C., & Natale, G. S. (2024). Integration of a battery of biomarkers to evaluate the health status of field-collected frogs of *Leptodactylus luctator* living in ecosystems with different anthropogenic disturbances. *Science of the Total Environment*, 933(173174). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173174>
- Beketov, M. A., Kefford, B. J., Schafer, R. B., & Liess, M. (2013). Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>
- Bertrand, L., & Iturburu, F. G. (2023). Pesticides bioassays using neotropical aquatic species: Trends during the last twenty years and future challenges in Argentina. *Chemosphere*, 326(138369). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138369>
- Bhuyan, K., Patar, A., Singha, U., Giri, S., & Giri, A. (2020). Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, Dicroglossidae) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(17). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08609-3>
- Bishop, P. C., & Hines, A. (2012). Teaching about the Future. *Palgrave Macmillan UK eBooks*, 1(16). https://doi.org/10.1057/9781137020703_1
- Borges, R. E., Raquel, L., Benvindo-Souza, M., Modesto, R. S., Assis, R. A., & Oliveira, C. de. (2019). Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(1). <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>
- Braga, R. da R., de Menezes Gondim, P., Pereira, R. M., Batista, B. L., & Matushima, E. R. (2022). *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) as a bioindicator of potentially toxic chemical elements in irrigated perimeters in northeastern Brazil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.encco.2022.02.003>

- Brasil. (2000). *LEI Nº 9.985, DE 18 DE JULHO DE 2000: institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza*. Planalto.gov.br.
https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9985.htm
- Brasil. (2018). *ANEXO DA RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2018*.
<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/anexo-da-resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view>
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2005). *Resolução nº 357, de 17 de março 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*. Diário Oficial da União.
https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf
- Cairo, M., Monnet, A.-C., Robin, S., Porcher, E., & Fontaine, C. (2024). Identifying pesticide mixtures at country-wide scale. *Peer Community Journal*, 4(100).
<https://doi.org/10.24072/pcjournal.472>
- Carpenter, S. R., Stanley, E. H., & Zanden, M. J. V. (2011). State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. *Annual Review of Environment and Resources*, 36(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-021810-094524>
- Carvalho, W. F., Ruiz, C., Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2019). DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*, 28(3).
<https://doi.org/10.1007/s10646-019-02029-x>
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükar, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74(3). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>
- Cui, N., Cai, M., Zhang, X., Abdelhafez, A. A., Zhou, L., Sun, H., Chen, G., Zou, G., & Zhou, S. (2020). Runoff loss of nitrogen and phosphorus from a rice paddy field in the east of China: Effects of long-term chemical N fertilizer and organic manure applications. *Global Ecology and Conservation*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01011>
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., & Lajmanovich, R. C. (2019). Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(1). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>
- da Rocha, M. C., dos Santos, M. B., Zanella, R., Prestes, O. D., Gonçalves, A. S., & Schuch, A. P. (2020). Preserved riparian forest protects endangered forest-specialists amphibian species against the genotoxic impact of sunlight and agrochemicals. *Biological Conservation*, 249, 108746. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108746>
- de Albuquerque, V. J., Folador, A., Müller, C., Pompermaier, A., Hartmann, M., & Hartmann, P. A. (2024). How do different concentrations of aluminum and zinc affect the survival, body size, morphology and immune system of *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) tadpole?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 87(8).
<https://doi.org/10.1080/15287394.2024.2311828>

- Demetrio, P. M., Iturburu, F. G., Collins, P. A., Menone, M. L., Venturino, A., Temporetti, P. F., Pedrozo, F. L., Amé, M. V., Quaini, K. P., & Speroni, A. R. (2022). Metodología para derivar niveles guía para la protección de la biodiversidad acuática. *Ecología Austral*, 32(1). <https://doi.org/10.25260/ea.22.32.1.1.1208>
- Dimitrova, B., & Lukanov, S. (2024). Contrasting effects of ammonium nitrate on tadpole survival, growth and behavior in two common anuran species. *Ecological Frontiers*, 44(4). <https://doi.org/10.1016/j.ecofro.2024.01.004>
- dos Santos, G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Skovronski, V. J., Müller, C., Pompermaier, A., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. (2024). 2,4-D-based herbicide underdoses cause mortality, malformations, and nuclear abnormalities in *Physalaemus cuvieri* tadpoles. *PubMed*, 277(109840). <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109840>
- Dudgeon, D. (2019). Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. In *Current Biology*. Elsevier.
- Dwyer, F. J., Burch, S. A., Ingersoll, C. G., & Hunn, J. B. (1992). Toxicity of trace element and salinity mixtures to striped bass (*Morone saxatilis*) and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(4). <https://doi.org/10.1002/etc.5620110409>
- Ehrsam, M., Knutie, S. A., & Rohr, J. R. (2016). The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(9). <https://doi.org/10.1002/etc.3377>
- Freitas, J. S., da Silva Pinto, T. J., Cardoso Yoshii, M. P., Conceição Menezes da Silva, L., de Palma Lopes, L. F., Pretti Ogura, A., Giroto, L., Montagner, C. C., de Oliveira Gonçalves Alho, L., Castelhana Gebara, R., Schiesari, L., & Gaeta Espíndola, E. L. (2022). Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. *Environmental Pollution*, 299(118894). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118894>
- FUNASA. (2013). *Manual práctico de análise de água*. http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf
- Galán-Acedo, C., Arasa-Gisbert, R., Arroyo-Rodríguez, V., Martínez-Ruiz, M., Rosete-Vergés, F. A., & Villalobos, F. (2023). Effects of habitat loss on Brazilian primates: assessing extinction thresholds in the Amazon and Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 21(2). <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2023.05.001>
- García-Moreno, J., Harrison, I. J., Dudgeon, D., Clausnitzer, V., Darwall, W., Farrell, T., Savy, C., Tockner, K., & Tubbs, N. (2014). Sustaining Freshwater Biodiversity in the Anthropocene. *The Global Water System in the Anthropocene*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07548-8_17
- Gazzola, A., Sacchi, R., Ghitti, M., & Balestrieri, A. (2018). The effect of thinning and cue: density ratio on risk perception by *Rana dalmatina* tadpoles. *Hydrobiologia*, 813(1). <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3510-6>
- Goessens, T., De Baere, S., Deknock, A., De Troyer, N., Van Leeuwenberg, R., Martel, A., ... & Croubels, S. (2022). Agricultural contaminants in amphibian breeding ponds: Occurrence, risk and correlation with agricultural land use. *Science of the Total Environment*, 806(150661).
- Gonçalves, M. W., Bertolino, C., Godoy, F. R., Gambale, P. G., Nunes, H. F., Nomura, F., & Bastos, R. P. (2019). Assessing Genotoxicity and Mutagenicity of Three Common Amphibian Species Inhabiting Agroecosystem Environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(3). <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00647-4>

- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, *16*(3).
- Gray, C. L., Hill, S. L. L., Newbold, T., Hudson, L. N., Börger, L., Contu, S., Hoskins, A. J., Ferrier, S., Purvis, A., & Scharlemann, J. P. W. (2016). Local biodiversity is higher inside than outside terrestrial protected areas worldwide. *Nature Communications*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms12306>
- Grill, G., Lehner, B., Thieme, M., Geenen, B., Tickner, D., Antonelli, F., Babu, S., Borrelli, P., Cheng, L., Crochetiere, H., Ehalt Macedo, H., Filgueiras, R., Goichot, M., Higgins, J., Hogan, Z., Lip, B., McClain, M. E., Meng, J., Mulligan, M., & Nilsson, C. (2019). Mapping the world's free-flowing rivers. *Nature*, *569*(7755). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1111-9>
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D., Lovejoy, T. E., Sexton, J. O., Austin, M. P., Collins, C. D., Cook, W. M., Damschen, E. I., Ewers, R. M., Foster, B. L., Jenkins, C. N., King, A. J., Laurance, W. F., Levey, D. J., Margules, C. R., & Melbourne, B. A. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, *1*(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052>
- Herek, J. S., Vargas, L., Rinas, A., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2020). Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *81*(103516). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>
- Higgins, J., Zablocki, J., Newsock, A., Krolopp, A., Tabas, P., & Salama, M. (2021). Durable Freshwater Protection: A Framework for Establishing and Maintaining Long-Term Protection for Freshwater Ecosystems and the Values They Sustain. *Sustainability*, *13*(4). <https://doi.org/10.3390/su13041950>
- Hoagland, B., Schmidt, C. M., Russo, T. A., Adams, R. D., & Kaye, J. P. (2019). Controls on nitrogen transformation rates on restored floodplains along the Cosumnes River, California. *Science of the Total Environment*, *649*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.379>
- Ikari, F. L., Viriato, C., França, F. M., Marcantonio, A. S., Bach, E. E., Cintia Badaró-Pedroso, & Ferreira, C. M. (2024). Behavioral and biochemical consequences after chronic exposition to the herbicide atrazine in tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, *59*(5). <https://doi.org/10.1080/03601234.2024.2326401>
- IUCN. (2024). *The IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN Red List of Threatened Species; IUCN. <https://www.iucnredlist.org>
- Jefferson, D. M., Hobson, K. A., & Chivers, D. P. (2013). Understanding the Information Value of Repeated Exposure to Chemical Alarm Cues: what Can Growth Patterns Tell us? *Annales Zoologici Fennici*, *50*(4). <https://doi.org/10.5735/085.050.04017>
- Jutta, T., Andrea-Nicole, R., Worth, A., Kienzler, A., Parissis, N., Lamon, L., Paini, A., & Bopp, S. K. (2016). *Review of case studies on the human and environmental risk assessment of chemical mixtures*. <https://doi.org/10.2788/272583>
- Kaushik, A., Sharma, H. R., Jain, S., Dawra, J., & Kaushik, C. P. (2010). Pesticide pollution of River Ghaggar in Haryana, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, *160*(1-4), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0657-z>
- Khoshnood, Z. (2017). Effects of Environmental Pollution on Fish: A Short Review. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, *19*(1). <https://doi.org/10.1515/trser-2017-0005>

- Kuznietsov, P. M., & Biedunkova, O. O. (2024). Multivariate regression studies for the investigation of the COD, BOD, and TOC concentrations in the water of the Styr River within the zone of influence of the power plant discharge. *Water Practice and Technology*, *19*(4).
<https://doi.org/10.2166/wpt.2024.075>
- Liu, L., Zheng, X., Wei, X., Kai, Z., & Xu, Y. (2021). Excessive application of chemical fertilizer and organophosphorus pesticides induced total phosphorus loss from planting causing surface water eutrophication. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02521-7>
- Lopes, A. T. de C., Benvindo-Souza, M., Sotero, D. F., Pedroso, T. M. A., Tomaz, A. A., Costa, A. G., Regina dos Santos Gois, A., Vieira, T. B., Bastos, R. P., & de Melo e Silva, D. (2025). Sublethal effects of atrazine concentrations exposure on tadpoles of *Dendropsophus minutus*: Evaluation of redox status, micronuclei frequencies and comet assay as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, *279*(107260). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107260>
- López-Pacheco, I. Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L. A., Barceló, D., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2019). Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *Science of the Total Environment*, *690*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.052>
- Luedtke, J. A., Chanson, J., Neam, K., Hobin, L., Maciel, A. O., Catenazzi, A., Borzée, A., Hamidy, A., Aowphol, A., Jean, A., Sosa-Bartuano, Á., Fong G., A., de Silva, A., Fouquet, A., Angulo, A., Kidov, A. A., Muñoz Saravia, A., Diesmos, A. C., Tominaga, A., & Shrestha, B. (2023). Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, *622*. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>
- Macagnan, N., Rutkoski, C. F., Folador, A., Skovronski, V. J., Müller, C., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. (2023). Mortality and toxicity of a commercial formulation of cypermethrin in *Physalaemus gracilis* tadpoles. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45090-7>
- McDowell, R. W., & Nash, D. (2012). A Review of the Cost-Effectiveness and Suitability of Mitigation Strategies to Prevent Phosphorus Loss from Dairy Farms in New Zealand and Australia. *Journal of Environmental Quality*, *41*(3). <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0041>
- Mkandawire, M., da Silva, J. A. T., & Dudel, E. G. (2014). The Lemna Bioassay: Contemporary Issues as the Most Standardized Plant Bioassay for Aquatic Ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *44*(2).
<https://doi.org/10.1080/10643389.2012.710451>
- Nolan, N., Hayward, M. W., Klop-Toker, K., Mahony, M., Lemckert, F., & Callen, A. (2023). Complex organisms must deal with complex threats: How does amphibian conservation deal with biphasic life cycles?. *Animals*, *13*(10), 1634.
- Nolan, N., Hayward, M., Callen, A., & Klop-Toker, K. (2025). Hydroperiod Influences Tadpole Growth and Development in the Endangered Littlejohn's Tree Frog (*Litoria littlejohni*). *Ecology and Evolution*, *15*(1). <https://doi.org/10.1002/ece3.70829>
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Fernández-Benítez, M. J., Lizana, M., & Marco, A. (2010). Adaptation to osmotic stress provides protection against ammonium nitrate in *Pelophylax perezi* embryos. *Environmental Pollution*, *158*(3). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.09.011>
- Orton, F., & Tyler, C. R. (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? *Biological Reviews*, *90*(4).
<https://doi.org/10.1111/brv.12147>

- Ossa-López, P. A., Castaño-Villa, G. J., & Rivera-Páez, F. A. (2017). Genotoxic effects and gene expression in *Danio rerio* (Hamilton 1822) (Cypriniformes: Cyprinidae) exposed to mining-impacted tributaries in Manizales, Colombia. *Environmental Monitoring and Assessment*, *189*(10). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6231-9>
- Pavan, F. A., Samojeden, C. G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Da Fé, S. P., Muler, C., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. (2021). Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two natives species of South American amphibians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *85*(103637).
- Peig, J., & Green, A. J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, *118*(12). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- Pekel, J.-F., Cottam, A., Gorelick, N., & Belward, A. S. (2016). High-resolution mapping of global surface water and its long-term changes. *Nature*, *540*(7633). <https://doi.org/10.1038/nature20584>
- Peluso, J., Chehda, A. M., Olivelli, M. S., Ivanic, F. M., Pérez Coll, C. S., Gonzalez, F., Valenzuela, L., Rojas, D., Cristos, D., Butler, M., Candal, R. J., & Aronzon, C. M. (2023). Metals, pesticides, and emerging contaminants on water bodies from agricultural areas and the effects on a native amphibian. *Environmental Research*, *226*(115692). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115692>
- Peluso, J., Furió Lanuza, A., Pérez Coll, C. S., & Aronzon, C. M. (2021a). Synergistic effects of glyphosate- and 2,4-D-based pesticides mixtures on *Rhinella arenarum* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(10). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16784-0>
- Peluso, J., Pérez Coll, C. S., & Aronzon, C. M. (2021b). 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*, *271*(129598). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129598>
- Peñuelas, J., & Sardans, J. (2022). The global nitrogen-phosphorus imbalance. *Science*, *375*(6578). <https://doi.org/10.1126/science.abl4827>
- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*(9). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>
- Pompermaier, A., Alves, C., Chagas, F. B., Tamagno, W. A., Bridi, C., Ferreira, G. F., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. (2024). Effects of glyphosate based herbicide exposure in early developmental stages of *Physalaemus gracilis*. *Scientific Reports*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76338-5>
- Pompermaier, A., Carolina, A., Mozzato, M. T., Soares, S. M., Fortuna, M., Alves, C., Tamagno, W. A., & José, L. (2022). Impaired initial development and behavior in zebrafish exposed to environmentally relevant concentrations of widely used pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *257*(109328). <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109328>
- Pompermaier, A., Kirsten, K., Soares, S. M., Fortuna, M., Kalichak, F., Idalencio, R., Koakoski, G., Barreto, R. E., & Barcellos, L. J. G. (2020). Waterborne agrichemicals compromise the anti-predatory behavior of zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(31). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09862-2>

- Prates, G. A. B. (2024). *ESTABELECIDAMENTO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA PARA AVALIAÇÃO DA POTABILIDADE* [Dissertação].
- Qian, D., Xu, C., Chen, C., Qin, J. G., Chen, L., & Li, E. (2020). Toxic effect of chronic waterborne copper exposure on growth, immunity, anti-oxidative capacity and gut microbiota of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, *100*.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.018>
- Ramadani, S., Marhendra, A., Wiadnya, D., & Kurniawan, N. (2022). Effect of Acute Toxicity of Commercial Organophosphate Insecticide Based on Chlorpyrifos on *Fejervarya limnocharis* Tadpoles (Anura: Dicroglossidae). *Journal of Tropical Life Science*, *12*(2).
<https://doi.org/10.11594/jtls.12.02.09>
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2018). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, *94*(3).
- Rezende, C. L., Scarano, F. R., Assad, E. D., Joly, C. A., Metzger, J. P., Strassburg, B. B. N., Tabarelli, M., Fonseca, G. A., & Mittermeier, R. A. (2018). From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*, *16*(4). <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2018.10.002>
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, *142*(6).
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- Rohr, J. R. (2021). The Atrazine Saga and its Importance to the Future of Toxicology, Science, and Environmental and Human Health. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *40*(6).
<https://doi.org/10.1002/etc.5037>
- Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., Pricila, S., Müller, C., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16039-z>
- Schäfer, R. B., von der Ohe, P. C., Rasmussen, J., Kefford, B. J., Beketov, M. A., Schulz, R., & Liess, M. (2012). Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems. *Environmental Science & Technology*, *46*(9).
<https://doi.org/10.1021/es2039882>
- Seferlis, P. (2008). Measurement and process control for water and energy use in the food industry. In *Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Water and Energy Management*. Woodhead Publishing Series.
- SEMA. (2018). *Parque Natural Municipal de Sertão*. Sema - Secretaria Do Meio Ambiente E Infraestrutura. <https://www.sema.rs.gov.br/parque-natural-municipal-de-sertao>
- Sertão. (2015). *Parque Natural Municipal de Sertão*. Prefeitura Municipal de Sertão. <https://www.sertao.rs.gov.br/pagina/561/parquenatural-municipal-de-sertao>
- Shimizu, N., Shimura, T., & Tanaka, T. (2000). Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *448*(1). [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00003-8)

- Silva, F. L., Prado, I. S., Fraga, R. E., Rocha, M. A., Juncá, F. A., & Silva, M. B. D. (2021). Swimming ability in tadpoles of *Physalaemus cf. cuvieri*, *Scinax x-signatus* and *Leptodactylus latrans* (amphibia: anura) exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 16(1).
<https://doi.org/10.5132/eec.2021.01.02>
- Slaviero, L., Budke, J., & Cansian, R. (2014). *As florestas do Parque Natural Municipal de Sertão*.
- Solomon, K. R., Carr, J. A., Du Preez, L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., & Van Der Kraak, G. J. (2008). Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(9).
<https://doi.org/10.1080/10408440802116496>
- Stehle, S., & Schulz, R. (2015). Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1500232112>
- Stehle, S., Bub, S., & Schulz, R. (2018). Compilation and analysis of global surface water concentrations for individual insecticide compounds. *Science of the Total Environment*, 639.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.158>
- Viriato, C., França, F. M., Santos, D. S., Marcantonio, A. S., Badaró-Pedroso, C., & Ferreira, C. M. (2021). Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, 266(129018).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>
- Wang, F., Wang, Y., Zhang, K., Hu, M., Weng, Q., & Zhang, H. (2021). Spatial heterogeneity modeling of water quality based on random forest regression and model interpretation. *Environmental Research*, 202(111660). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111660>
- Wingen, N. M. de A., Cubas, G. K., & Oliveira, G. T. (2023). Impact of 2,4-D and glyphosate-based herbicides on morphofunctional and biochemical markers in *Scinax squaleirostris* tadpoles (Anura, Hylidae). *Chemosphere*, 340(139918).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139918>
- Zambrano-Fernández, S., Zamora-Camacho, F. J., & Aragón, P. (2022). Direct and indirect effects of chronic exposure to ammonium on anuran larvae survivorship, morphology, and swimming speed. *Chemosphere*, 287(132349). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132349>
- Zhang, X., Zhang, Y., Shi, P., Bi, Z., Shan, Z., & Ren, L. (2021). The deep challenge of nitrate pollution in river water of China. *Science of the Total Environment*, 770(770).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144674>