



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA**

Djonatan Artur Rosemann

**Efeito de cinzas oriundas de incêndios sobre o comportamento de *Aquarana catesbeiana*
(Amphibia: Anura)**

*(Fire ash effects on behavior of *Aquarana catesbeiana* (Amphibia: Anura))*

**Florianópolis, SC
Dezembro De 2023**

Djonatan Artur Rosemann

**Efeito de cinzas oriundas de incêndios sobre o comportamento de *Aquarana catesbeiana*
(Amphibia: Anura)**

*(Fire ash effects on behavior of *Aquarana catesbeiana* (Amphibia: Anura))*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro Ciências biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Bruno Renaly Souza Figueiredo

Coorientador: Me .Leonardo Leite Ferraz de Campos

Florianópolis SC

2023

Rosemann, Djonatan Artur

Efeito de cinzas oriundas de incêndios sobre o comportamento de *Aquarana catesbeiana* (Amphibia: Anura) : Fire ash effects on behavior of *Aquarana catesbeiana* (Amphibia: Anura) / Djonatan Artur Rosemann ; orientador, Bruno Renaly Souza Figueiredo , coorientador, Leonardo Leite Ferraz Campos, 2023.

34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Ecotoxicologia. 3. Ecologia comportamental. 4. Invasões Biológicas. 5. Mudanças climáticas. I. Figueiredo , Bruno Renaly Souza . II. Campos, Leonardo Leite Ferraz . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Djonatan Artur Rosemann

**Efeito de cinzas oriundas de incêndios sobre o comportamento de *Aquarana catesbeiana*
(Amphibia: Anura)**

**Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel
e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas**

Universidade Federal de Santa Catarina, 05 de Dezembro de 2023.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Profa , Dra Michele Cristina Heck

Prof, Dr Renato Hajenius Ache de Freitas

Orientador(a):

Prof.(a) Dr.(a) Bruno Renaly Souza Figueiredo

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis , 2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito provavelmente esse projeto não teria sido possível sem a orientação e conselhos de várias pessoas excepcionais que eu conheci ao longo do curso.

Primeiramente gostaria de agradecer tanto ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Renaly Souza Figueiredo

quanto ao meu coorientador Me .Leonardo Leite Ferraz de Campos, pelas suas orientações dedicadas, paciência sem limites e conselhos valiosos.

Agradeço também a minha família, expressei minha gratidão pelo apoio e encorajamento constante e ajuda que me prestaram durante todo o curso.

Aos meus amigos, pessoas que com o tempo acabaram fazendo parte da minha família, e me apoiaram de diversas formas, agradeço muito.

Agradeço também ao meu laboratório e seus membros que me ajudaram durante a realização do trabalho.

Resumo

A relação entre mudanças climáticas, a ocorrência de incêndios e a diminuição da diversidade de anfíbios têm sido uma preocupação crescente à medida que distúrbios associados ao fogo se tornam mais frequentes. As cinzas resultantes da supressão vegetal pelo fogo podem ser transportadas para ambientes aquáticos por ação das chuvas e dos ventos, ameaçando as populações de anfíbios que habitam esses ecossistemas. Nesse estudo, avaliamos o impacto sobre a sobrevivência e o comportamento de girinos da espécie *Aquarana catesbeiana* (Amphibia: Anura) à exposição a diferentes concentrações de cinzas (0g/L, 2g/L, 4g/L, 6g/L e 8g/L). O número de indivíduos sobreviventes mensurados ao final do experimento foi usado para calcular a concentração letal para 50% da população (LC50). Além disso, avaliamos o deslocamento total e a velocidade máxima de nado dos girinos após exposição a cada tratamento. Nossos resultados demonstraram que a sobrevivência dos girinos não diferiu estatisticamente entre as diferentes concentrações de cinzas, com uma concentração letal para 50% da população calculada em 15,92 g/L. O deslocamento total e a velocidade máxima de nado de girinos pós-exposição às cinzas também não diferiu entre as concentrações de cinzas. Estudos realizados com peixes e cinzas de outras origens reportaram valores de LC50 menores do que 2g/L, enquanto que o LC50 calculado para o microcrustáceo *Daphnia magna* foi de 7,98 g/L. Portanto, muito inferior ao encontrado no presente estudo para a espécie estudada. Esses resultados revelam uma grande resistência de *A. catesbeiana* quando expostos a água contaminada por cinzas. Uma notável resistência à contaminação aquática, pode explicar o maior sucesso de invasão biológica do mundo. A maior resistência *A. catesbeiana* sugere que, no cenário ambiental predito para o futuro, com incêndios mais frequentes como resultado das alterações climáticas globais, e consequente contaminação da água por cinzas, essa espécie exótica invasora de anuros pode aumentar a sua área de distribuição, devido sua maior tolerância à contaminação, o que pode ameaçar a conservação da biodiversidade nativa.

Palavras-chave: Ecologia aquática, Ecotoxicologia, Espécie invasora, Mudanças climáticas, Toxicidade

Abstract

The relationship between climate change, the occurrence of fires, and the decline in amphibian diversity has been a growing concern as fire-related disturbances become more frequent. Ash resulting from vegetation burnby fire can be transported to aquatic environments through the action of rain and wind, threatening amphibian populations that inhabit these ecosystems. In this study, we assessed the impact of exposure to ashes on the survival and behavior of *Aquarana catesbeiana* (Amphibia: Anura). To do so, an ecotoxicological assay was conducted in which five tadpoles were exposed to five concentrations of ashes (0g/L, 2g/L, 4g/L, 6g/L, and 8g/L) for 96 hours. At the end of this period, the number of surviving individuals was measured to calculate the lethal concentration for 50% of the population (LC50). Additionally, we evaluated the total displacement and maximum swimming speed of tadpoles after exposure to the ashes. Our results showed that tadpole survival did not statistically differ among the different ash concentrations, with an LC50 calculated at 15.92 g/L. Furthermore, the total displacement

and maximum swimming speed of tadpoles after exposure to the ashes did not differ among the ash concentrations either. Studies conducted with fish and ashes from other sources reported LC50 values lower than 2g/L, whereas the LC50 calculated for the microcrustacean *Daphnia magna* was 7.98 g/L. This number is much lower than that found in this study. This reveals a significant resistance of *A. catesbeiana* when exposed to water contaminated by fire ashes. Remarkable resistance to aquatic contamination by *A. catesbeiana* may explain why it is among the most successful invasive species worldwide. The greater resistance of *A. catesbeiana* also suggests that, in the environmental scenario predicted for the future, with more frequent fires as a result of global climate change and subsequent water contamination by ashes, this invasive exotic tadpole species may expand its distribution range, which could threaten the conservation of native biodiversity.

Keywords: Aquatic ecology, ecotoxicology, Exotic species, Climate changes, Toxicity

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1 - Esquema do delineamento experimental usado para testar a toxicidade de cinco diferentes concentrações de cinzas na água (0 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L e 8 g/L) sobre girinos (n=5) de *Aquarana catesbeiana*.18
2. Figura 2 - Esquema da análise comportamental usado para testar o deslocamento total de girinos de *Aquarana catesbeiana* e sua velocidade máxima de movimento.....19
3. Figura 3 - Sobrevivência de indivíduos de *Aquarana catesbeiana* após exposição de 96 horas (eixo Y) às cinzas, em diferentes concentrações (eixo X). Linha sólida preta representa o melhor ajuste de modelo para os dados utilizando a curva “Probit”. Linha tracejada indica o limiar de 50% de sobrevivência dos girinos. Zona cinza denota o intervalo de confiança (95%). Círculos indicam a resposta encontrada para cada unidade experimental. 23
4. Figura 4 - Distância total (*DT*, em cm) percorrida por girinos *Aquarana catesbeiana* (eixo y) após exposição (96 h) a diferentes concentrações de cinzas (eixo x), em um total de uma hora de gravação. Os nomes “controle”, “tratamento 2”, “tratamento 4”, “tratamento 6” e “tratamento 8” referem-se respectivamente a 0 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L e 8 g/L de cinzas.....25
5. Figura 5 -Velocidade máxima (*VM*, em cm) atingida por girinos *A. catesbeiana* (eixo y) após exposição (96 h) a diferentes concentrações de cinzas (eixo x), em um total de uma hora de gravação. Os nomes “controle”, “tratamento 2”, “tratamento 4”, “tratamento 6” e “tratamento 8” referem-se respectivamente a 0 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L e 8 g/L de cinzas.....26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Tabela 1 – Resultados da análise dos compostos inorgânicos presente nas cinzas oriundas da queima de biomassa vegetal típica da serra Catarinense.....16
- Tabela 2 - Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) encontrados em 100 mg de cinzas oriundas da queima de biomassa vegetal típica da serra Catarinense.....17
- Tabela 3 – Resultados das Análises de Variância (ANOVAs) testando o efeito da exposição às cinzas sobre o deslocamento total e a velocidade máxima de nado de girinos de *Aquarana catesbeiana*.....23

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. MÉTODOS.....	14
3.1 ESPÉCIE ESTUDADA.....	14
3.2 LOCAL DE COLETA E MODO DE CRIAÇÃO.....	14
3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO COM CINZAS.....	15
3.4 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	15
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3.5.1. LC50 e sobrevivência.....	15
3.5.2. Velocidade natatória e deslocamento total.....	16
3.6 OBTENÇÃO DE DADOS.....	17
3.6.1. DETERMINAÇÃO DO LC50.....	17
3.6.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	17
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	18
3.8 DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA EM AMOSTRA DE CINZAS ORIUNDAS DE BIOMASSA VEGETAL.....	18
3.8.1 ANÁLISE QUÍMICA DAS CINZAS.....	18
3.8.2 PROCEDIMENTOS.....	19
3.8.3 EQUIPAMENTOS.....	19
4. RESULTADOS.....	19
4.1 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA.....	19
4.2 TESTE DE MOBILIDADE.....	20
4.3 TESTE DE VELOCIDADE.....	22
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

O fogo é a consequência de uma reação de oxidação rápida de um material combustível, que é capaz de causar elevado impacto ambiental. Quando a biomassa vegetal seca queima, ela não apenas causa a perda de abundância e diversidade de espécies vegetais, mas também leva à redução e simplificação dos habitats disponíveis para diferentes espécies (Shailesh *et al* 2022; Agus *et al* 2019). Isso afeta a capacidade dos ecossistemas de servirem como refúgio contra predadores e reduz a disponibilidade de alimento e de energia para as espécies que vivem neles (Bixby *et al.*, 2015). Em regiões com o clima seco, o fogo é frequente devido a presença de vegetação ressecada, o que aumenta a probabilidade de ocorrência e propagação de incêndios (Kloster & Lasslop, 2017; Rogers *et al* 2020). Essa situação se agrava devida às mudanças climáticas e à conversão de áreas naturais, principalmente em pastagem, o que tem ampliado as áreas propensas a incêndio, resultado em uma maior frequência e intensidade desses eventos nos últimos anos (Bixby *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2022; Burton *et al.*, 2023).

Um dos principais problemas associados à ocorrência de incêndios é a produção de cinzas residuais, que possuem em sua composição múltiplos compostos tóxicos que podem alterar as características bióticas (redução na disponibilidade de recurso), físicas (perda de habitat) e químicas da água e do solo. Na água, a presença de cinzas pode acarretar no aumento dos valores de pH, condutividade, turbidez e na diminuição dos valores de oxigênio dissolvido (Earl & Blinn, 2003; Gonino *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2019). Além disso, as concentrações de alguns nutrientes, tais como fósforo (Minshall *et al.*, 2001; Venne *et al.*, 2015), nitrato (Minshall *et al.*, 2001; Earl & Blinn, 2003), amônio (Earl & Blinn, 2003), cálcio e potássio (Minshall *et al.*, 2001) também podem ser alterados após ocorrência de queimadas de vegetação ao redor de um rio ou lago. As cinzas contêm ainda hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e metais (Neary *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2011). Essas substâncias possuem potencial tóxico e, em altas concentrações, as cinzas podem até mesmo causar a morte dos organismos aquáticos. Além disso em concentrações menores, a presença de cinzas na água podem induzir letargia e prejudicar a habilidade de natação de organismos aquáticos, como resultado, esses organismos podem se tornar mais suscetíveis à predação (Gonino *et al.*, 2019).

A maior parte dos organismos que prevalece em regiões lacustres após um incêndio são indivíduos resistentes ao fogo, ou que possuam características que os conferem rápida recolonização do ambiente, tais como reprodução explosiva e ciclo de vida rápido (Minshall *et*

al., 2003). Esses estudos já foram realizados com peixes e têm demonstrado que espécies exóticas invasoras são especialmente resistentes à contaminação da água por cinzas sensíveis (Gonino *et al.*, 2019), o que pode potencializar o sucesso de invasão em áreas sujeitas a fogo. Outro grupo de animais aquáticos que está sujeito a estes impactos são os anfíbios, já que a maior parte das espécies dependem desses ambientes para completar o seu ciclo de vida. Embora não haja estudos testando como espécies exóticas invasoras de girinos respondem a contaminação da água por cinzas, é possível hipotetizar com base em estudos com outros contaminantes, que tais espécies sejam mais tolerantes a alterações antropogênicas (D'amore *et al.*, 2010).

Os anfíbios são reconhecidos como um dos grupos de vertebrados mais ameaçados de extinção (Stuart *et al.*, 2004; Luedtke *et al.*, 2023). Uma das principais razões para essa ameaça é a manipulação ou até mesmo o desaparecimento de seus habitats devido à contaminação da água (Marchand *et al.*, 2019). A exposição a substâncias químicas durante o estágio larval dos anfíbios pode resultar em uma série de alterações ontogenéticas, citológicas e histológicas, assim como modificações na estrutura populacional e nas interações ecológicas (David *et al.*, 2012). Tais alterações durante o desenvolvimento larval de anfíbios anuros levam à perda de biodiversidade, o que pode se propagar em diferentes níveis tróficos, com impactos indiretos sobre a dinâmica de todo o ecossistema (Borges *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2019; Mann *et al.*, 2009). A maior parte das espécies de anfíbios têm fertilização e desenvolvimento embrionário externo, com ovos aquáticos ou semiaquáticos que não possuem proteção de casca (Bishop *et al.*, 1999; Gallant *et al.*, 2007; Schiesari *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2009; Allentoft & O'Brien, 2010). Além disso, os anfíbios são especialmente suscetíveis à contaminação da água porque sua pele é permeável e altamente vascularizada devido a respiração cutânea destes animais, dessa forma, tornando os anfíbios essenciais em estudos ecotoxicológicos e testes de toxicidade (Wolkowicz *et al.*, 2013).

A espécie escolhida para este trabalho, *Aquarana catesbeiana* (rã-touro), comumente encontrada em todo o Brasil, principalmente devido à introdução da ranicultura que ocorre desde os anos 1940. A habilidade invasiva do rã-touro e sua habilidade de se adaptar a diversos habitats têm gerado preocupações para a preservação da biodiversidade (Borges *et al.*, 2002). Devido aos seus hábitos alimentares versáteis, comportamento predatório e grande tamanho corporal, essa espécie impacta as comunidades nativas, desencadeando impactos ecológicos que incluem a extinção de outras espécies por competição, predação e transmissão de patógenos (Daszak *et al.*, 2004; Schloegel *et al.*, 2010). Apesar de ser classificada como uma das cem espécies invasoras mais problemáticas no mundo por causa de sua resistência,

capacidade predatória e dispersão de doenças, pouco se discute sobre legislações para remediação da presença desse animal em outros ecossistemas onde ele pode ser considerado não apenas como um invasor mas também como uma praga para outras espécies nativas (Lowe *et al.*, Ota, 2002),

Considerando que a maior parte dos trabalhos realizados que investigaram o impacto de poluentes sobre a biologia de anfíbios em seu estágio larval, utilizou poluentes de origem farmacêutica, hospitalar ou agrícola (Allran & Karasov, 2000; Borges *et al.*, 2019), realizamos um experimento para investigar o efeito da contaminação da água por cinzas oriundas de incêndios. Avaliamos efeitos sobre a mortalidade e o comportamento (velocidade natatória e deslocamento) em indivíduos da espécie *A.catesbeiana*. Com isso, testamos a hipótese de que a relação entre a concentração de cinzas, mortalidade e comportamento (mais especificamente velocidade de movimento e distância total percorrida no período de uma hora) dos girinos seria positivamente, isto é, quanto maior a concentração, maior seria a taxa de mortalidade e as alterações de velocidade e deslocamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das cinzas na sobrevivência e comportamento de girinos de *A.catesbeiana* quando expostos a cinzas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encontrar a concentração sub letal capaz de causar a morte de 50% da população de *A.catesbeiana* (LC50)
- Comparar a velocidade natatória e deslocamento total de girinos da espécie invasora (*A.catesbeiana*) exposta a diferentes concentrações de cinzas na água.

3. MÉTODOS

3.1 ESPÉCIE ESTUDADA E LOCAL COLETA

Aquarana catesbeiana, popularmente conhecida no Brasil como rã-touro, foi escolhida como organismo-teste para ser utilizada nos ensaios ecotoxicológicos. A escolha dessa espécie se deu porque ela possui ampla distribuição global, largamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos como em Tokiwa *et al* 2015), além de ser facilmente coletada e comercializada. A rã-touro é uma espécie de rã nativa da América do Norte, que ocorre naturalmente nos Estados Unidos, Canadá e México e cresce de forma substancial durante toda a vida, podendo atingir até 30cm de comprimento e 1,5 kg de massa quando adultos (Cunha, 2009). Seus girinos podem atingir até 20 cm de comprimento. Estes organismos habitam áreas alagadas permanentemente, como poças e lagos, tendo uma elevada taxa reprodutiva e podendo apresentar comportamento agonístico muito característico durante sua época reprodutiva (Ryan 1980). Devido a ação humana essa espécie tem se espalhado por todo o globo, comprometendo várias outras espécies. Dentre os impactos ambientais causados por ação da rã-touro destaca-se a capacidade de ingerir alimento de vários recursos de níveis tróficos distintos, desde insetos até mesmo outros anuros, sendo uma ameaça às comunidades nativas.

Os animais utilizados no experimento foram adquiridos de uma ranicultura localizada na região norte do estado, na cidade de Jaraguá do Sul (26°29'7" S e 49°4'2" W). Nesta ranicultura, o processo de criação dos girinos inclui várias etapas e abrange diferentes estágios de desenvolvimento, cada em uma área específica, A temperatura da água pode variar entre 25 e 30°C, pH entre 6,5 e 7,5 e a umidade relativa superior a 70%, para evitar a desidratação dos indivíduos. Os animais recém eclodidos, no estágio G1, não possuem sistema digestivo próprio, mas bolsa vitelínica e brânquias externas. Entre 5 a 7 dias, o vitelo é consumido, as brânquias se interiorizam e o estágio G1 passa para G2. Neste momento o indivíduo busca ativamente alimento na água. A alimentação no estágio G2 é manejada com a combinação entre ração específica para rãs e alimento natural (tenebrios). Ainda no estágio G2, os girinos são transferidos para tanques maiores, a área de crescimento e desenvolvimento larval. Após algum tempo, eles chegam ao estágio G3, desenvolvendo pernas perto da cauda e se aproximando do clímax metamórfico. Quando os braços se formam rompendo a pele, os girinos atingem a fase G4. Essa fase dura cerca de 10 dias, terminando quando a cauda é absorvida. Girinos em G4 são separados em uma área de metamorfose, com plantas aquáticas e pouca água, facilitando a transição para o meio terrestre (CRIBB, 2013). O estágio de

desenvolvimento dos girinos utilizados nesse experimento foi determinado segundo a tabela de Gosner (GOSNER, 1960). Os girinos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos do presente estudo estavam no estágio G25.

3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO COM CINZAS

As amostras de cinzas utilizadas para o estudo foram provenientes da queima da vegetação típica de campos de altitude da serra catarinense. Para tanto, foi realizada a poda de indivíduos em uma área de 20 x 1m, que incluía principalmente *Andropogon lateralis*, *Axonopus suffultus* e *Baccharis uncinella*, no Parque Nacional de São Joaquim, Urubici, Santa Catarina (28°10'22" S e 49°35'56" W). Após a coleta, o material vegetal foi seco ao sol e submetido ao processo de queima, em condições controladas, para geração de cinzas. Uma vez incineradas, as cinzas resultantes foram peneiradas, colocadas em tubos Falcon de 15ml e mantidas sob refrigeração em uma temperatura de -20°C. Este processo é realizado visando conservar as cinzas das alterações na composição química devido a ações biológicas ou fotólise (Santos *et al.*, 2023).

3.3 ANÁLISE QUÍMICA DAS CINZAS

Para avaliar a composição inorgânica e orgânica das cinzas foi realizada uma análise semi-quantitativa de uma amostra (100g) de cinzas com a técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS, (marca Perkin Elmer, modelo Elan 6000, Thornhill, Canadá) com introdução da amostra por nebulizador pneumático. A amostra foi preparada por digestão ácida com assistência de microondas (marca provector modelo DGT100, São Paulo) para uma posterior determinação semi-quantitativa dos analitos. Os resultados dessa análise revelaram níveis elevados de Potássio e Boro (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da análise dos compostos inorgânicos presente nas cinzas oriundas da queima de biomassa vegetal típica da serra Catarinense.

ANALITOS	CONCENTRAÇÃO OBTIDA (mg/Kg)
B	52.621
Na	4070
Mg	25.387
Al	9446
Si	2295

K	91.123
Ti	654
Mn	2651
Fe	6698
Rb	202
Ca	1843

Foi conduzida uma análise utilizando ultrassom por 20 minutos, utilizando uma concentração de 100 gramas de cinzas em 3 ml de uma solução de hexano:acetona (9:1), repetida por três vezes. Em seguida, foi realizado um processo de limpeza (clean up), seguido de filtração e evaporação. Adicionalmente, houve uma agitação por 24 horas de 100 mg dessas cinzas em 50 mL de água ultrapura. Durante essa análise, foram identificados em grande quantidade os compostos Pireno e Fenantreno.(Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) encontrados em 100 mg de cinzas oriundas da queima de biomassa vegetal típica da serra Catarinense.

Compostos	Extrato aquosos de cinzas volantes (ug/L)	Cinzas (ng/g)
Naftaleno	<0,15	877
Acenaftileno	<0,15	<33
Acenaftaleno	<0,15	<33
Fluoreno	<0,15	463
Fenantreno	<0,15	2144
Antraceno	<0,15	371
Fluoranteno	<0,15	653
Pireno	<0,15	1863
Benz[a]antraceno	<0,15	305
Criseno	<0,15	142
Benzo[b]fluoranteno	<0,15	<76
Benzo[k]fluoreteno	<0,15	<76

Benzo[a]pireno	<0,15	<76
Indeno[1,2,3-cd]pireno	<0,15	<76
Dibenzo[a,h]antraceno	<0,15	<76
Benzo[ghi]preileno	<0,15	<76

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Realizou-se um ensaio ecotoxicológico que buscou avaliar o efeito da exposição de girinos de *A. catesbeiana* a diferentes concentrações de cinzas. Para tanto, cinco girinos (comprimento total = 5 cm) foram colocados em aquários retangulares (25 cm de comprimento, 20 cm de largura e 20 cm de profundidade, preenchidos com 5 litros de água sem cloro), aclimatadas por 24 horas e após isso expostos a uma das cinco concentrações de cinzas estudadas, durante todo o período do experimento os aquários foram aerados com o auxílio de uma bomba de oxigênio submersa e pedras porosas. As concentrações escolhidas foram: 0g/L, 2g/L, 4g/L, 6g/L e 8g/L definidas com base em Santos *et al.* (2023), (Figura 1). O tempo de exposição foi de 96 horas, e cada tratamento foi replicado quatro vezes (n = 20). As respostas observadas ao final do tempo de exposição foram a mortalidade (com cálculo do LC50) e o comportamento de girinos (velocidade natatória e deslocamento total).

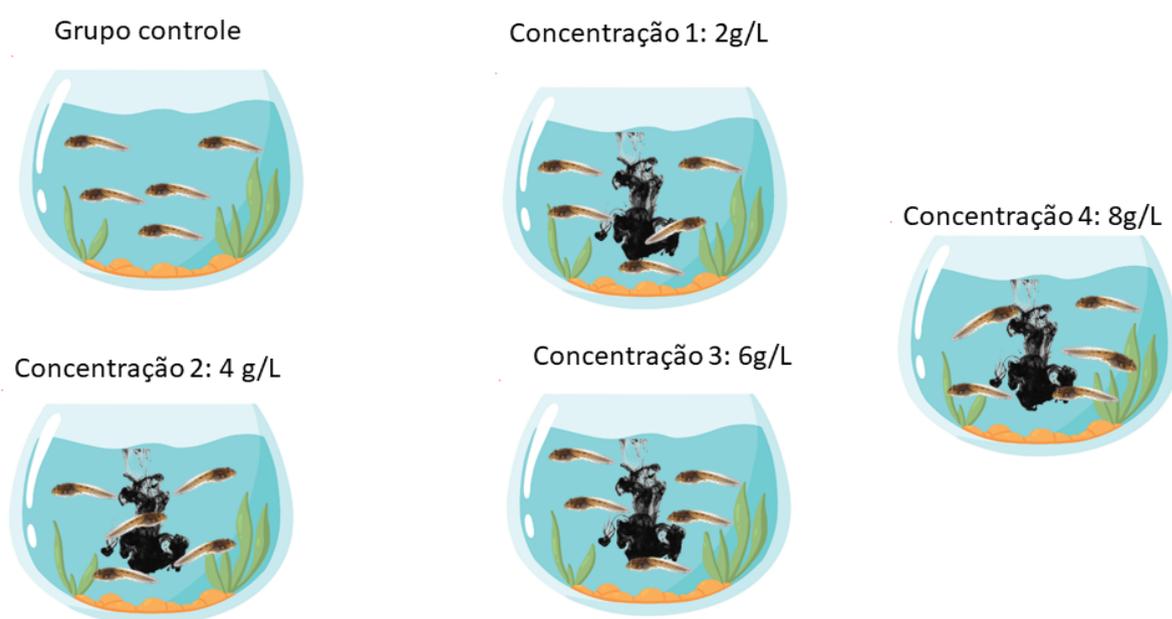


Figura 1 - Esquema do delineamento experimental usado para testar a toxicidade de cinco diferentes concentrações de cinzas na água (0 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L e 8 g/L) sobre girinos de *Aquarana catesbeiana* (n=5)

As cinzas não foram adicionadas diretamente nas unidades experimentais. Em vez disso, quatro extratos aquosos foram preparados, para isso as cinzas foram armazenadas e refrigeradas no Laboratório de Biodiversidade Aquática e posteriormente foram maceradas com o uso de um pistilo e almofariz, após isso foram peneiradas com o auxílio de uma peneira de cozinha e acondicionados em erlenmeyer envolto em papel alumínio para evitar o contato com a luz UV, para o preparo do extrato aquoso, as cinzas já maceradas e peneiradas foram acondicionados em galões de Polietileno (4 L) e agitados manualmente para melhorar a solubilização das cinzas na água. Foi adicionado um litro do extrato aquoso a cada unidade experimental, sorteada aleatoriamente, para obter quatro concentrações de cinzas. Cada galão de polietileno recebeu uma das concentrações previamente determinadas para o experimento (0g/L, 2g/L, 4g/L, 6g/L e 8g/L).

Ao final do tempo de exposição (96 h), cinco indivíduos sobreviventes de cada uma das cinco concentrações de cinzas foram aleatoriamente selecionados das diferentes unidades experimentais. Estes girinos foram então inseridos individualmente em aquários retangulares (61,5 cm de comprimento, 33 cm de largura e 36cm de altura, preenchidos com 10 litros de água desclorificada), onde foram alimentados com ração (Santos *et al.* 2022). E permaneceram por 24h. Após esse período, realizamos a filmagem dos organismos por uma hora para avaliar o impacto da exposição às cinzas sobre a mobilidade dos girinos. As filmagens foram realizadas utilizando uma câmera (Webcam C920s PRO HD) posicionada acima dos aquários (Figura 2). Os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram autorizados pelo Comitê de ética para uso em animais em experimentação (CEUA) da UFSC, sob o número:

1639081122.

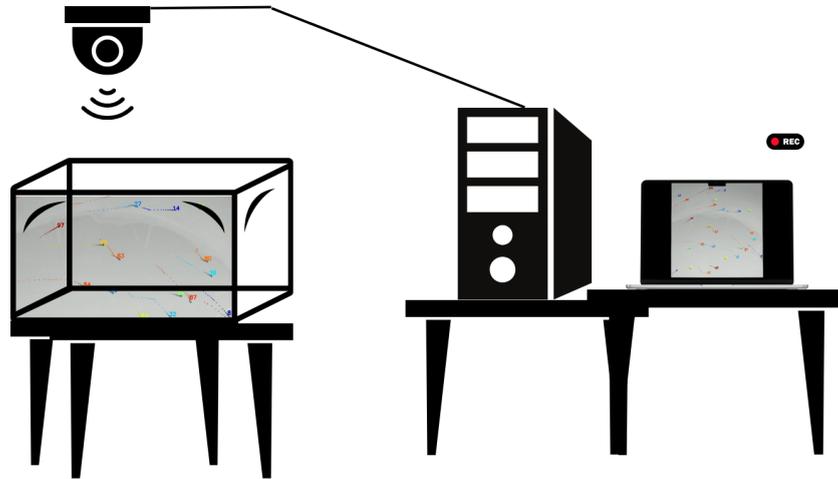


Figura 2 - Esquema da análise comportamental realizada para testar o efeito das cinzas sobre o deslocamento total de girinos de *Aquarana castebeiana* e sua velocidade máxima de movimento.

3.5 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

Para caracterizar as variáveis abióticas em cada um dos aquários no início do experimento, utilizamos medidores portáteis para medir o pH, a condutividade, o oxigênio dissolvido e a temperatura diretamente em cada unidade experimental, a 20 cm abaixo da superfície da água.

O Potencial Hidrogeniônico da água no período do experimento foi uma média de 9,26 para o grupo controle e variou em média entre 8,2 e 8,07 durante as 24 horas de experimento.

A temperatura da água no mesmo período teve uma média de 19,21°C nas primeiras 24 horas e 20,36°C em média após os três dias de exposição (tabela 4).

Quanto ao oxigênio dissolvido nas primeiras 24 horas foi encontrado 10,73 mg/L ao final do experimento a quantidade de oxigênio dissolvido caiu drasticamente chegando a 6,39mg/L.

3.6 OBTENÇÃO DE DADOS

3.6.1. DETERMINAÇÃO DO LC50

Após o período de 96 horas de exposição às cinzas, os girinos foram cuidadosamente removidos das unidades experimentais, tendo o cuidado para que toda a movimentação dos mesmos fosse feita sempre em baixa de água para evitar o estresse dos indivíduos, colocando os mesmos em sacos plásticos com água na hora do deslocamento para os aquários e aclimatando os mesmos antes de liberá-los no aquário. Para a determinação do LC50 foi contabilizado o número de girinos sobreviventes em cada concentração de cinzas. Os indivíduos que não sobreviveram foram armazenados em álcool e depositados na coleção didática de Zoologia.

3.6.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A avaliação da mobilidade dos cinco girinos de *A. catesbeiana* de cada tratamento teve início 24 horas após a exposição inicial. Essas avaliações nos permitiram calcular o deslocamento total dos organismos, que representa a distância percorrida por cada indivíduo ao longo de uma hora, bem como a velocidade máxima de nado, que corresponde à maior velocidade alcançada pelos girinos durante esse período de uma hora de gravação.

No total, foram avaliadas 25 horas de gravações em vídeo, divididas em cinco sessões de cada uma das concentrações e do controle. As filmagens foram avaliadas em ordem aleatória para reduzir algum viés de confirmação relacionado à sequência de avaliação. Para as avaliações foi utilizado o programa Kinovea, um programa de análise de movimento esportivo (disponível em www.kinovea.org). No software, a trajetória total de *A. catesbeiana* ao longo de todo o período de filmagem foi registrada e utilizada para coletar os valores de distância total percorrida (em centímetros) e velocidade máxima de nado (m/s) (Figura 2).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Para obter a concentração capaz de provocar mortalidade de 50% da população de *A. catesbeiana* expostas a cinzas (LC50) construímos um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição “binomial” e função de ligação “Probit”. Os valores de mortalidade de indivíduos serviram como variável resposta enquanto cada concentração de cinzas utilizada como variável preditora no modelo.

Para investigar se o deslocamento total dos girinos de *A. catesbeiana* e a velocidade máxima de nado foram afetados pela exposição dos girinos às cinzas, realizamos análises de

variância de um fator (ANOVA *one-way*). Nestas análises (uma para cada comportamento) utilizamos como variáveis preditoras a concentração de cinzas (variável categórica com cinco níveis: 0g, 2g, 4g, 6g e 8g de cinzas por litro de água), e como variáveis respostas a velocidade máxima de nado e deslocamento total. As análises foram feitas utilizando o software de análise estatística R utilizando os pacotes: ggpubr (R Core team, 2023).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DAS CINZAS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA

Os valores de sobrevivência de *A. catesbeiana* não diferiram significativamente entre as concentrações de cinzas ($Z= 0,142$; $gl=19$; $P=0,887$; Figura 3). A concentração letal de cinzas para 50% da população de girinos (LC50) foi estimada em 15,92 g/L.

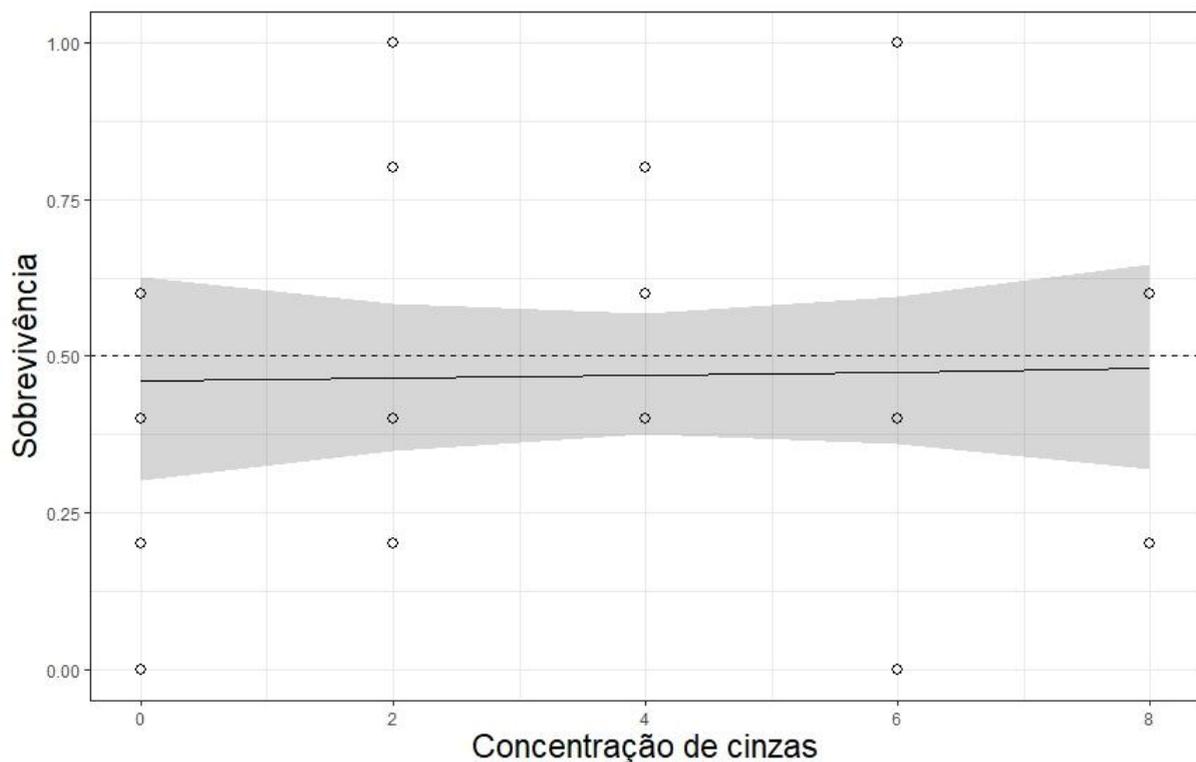


Figura 3 - Sobrevivência de indivíduos de *A. catesbeiana* (eixo Y) após exposição de 96 horas às diferentes concentrações de cinzas (eixo X). Linha sólida preta representa o melhor ajuste de modelo para os dados utilizando a curva "Probit". Linha tracejada indica o limiar de 50% de sobrevivência dos girinos. Zona cinza representa o intervalo de confiança (95%). Círculos indicam a resposta encontrada para cada unidade experimental.

4.2 EFEITO DAS CINZAS SOBRE O COMPORTAMENTO

A mobilidade dos girinos de *A. catesbeiana* não foi significativamente afetada pela exposição às cinzas, já que tanto o deslocamento total quanto a velocidade máxima de nado não variaram entre as diferentes concentrações de cinzas. Em média, o deslocamento dos indivíduos do grupo controle foi menor ($3288,64 \pm 1975,73$ cm, média \pm desvio padrão) que todos as demais concentrações de cinzas (2g = $6639,87 \pm 2967,59$ cm, 4g = $5099,66 \pm 2931,63$ cm, 6g = $5099,66 \pm 1685,12$ cm, 8g = $4162,94 \pm 1904,42$ cm). Entretanto, dentro de cada tratamento houve muita variação de resultados (Figura 3).

Tabela 3 – Resultados das Análises de Variância (ANOVAs) testando o efeito da exposição às cinzas sobre o deslocamento total e a velocidade máxima de nado de girinos de *Aquarana catesbeiana*.

<i>Variável resposta: Deslocamento total</i>					<i>Variável resposta: Velocidade máxima</i>				
	Graus de liberdade	Média dos quadrados	<i>F</i>	<i>P</i>		Graus de liberdade	Média dos quadrados	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentração	4	7755949	1,396	0,271	Concentração	4	0,3277	0,632	0,646
Resíduo	20	5554215			Resíduo	20	0,5189		

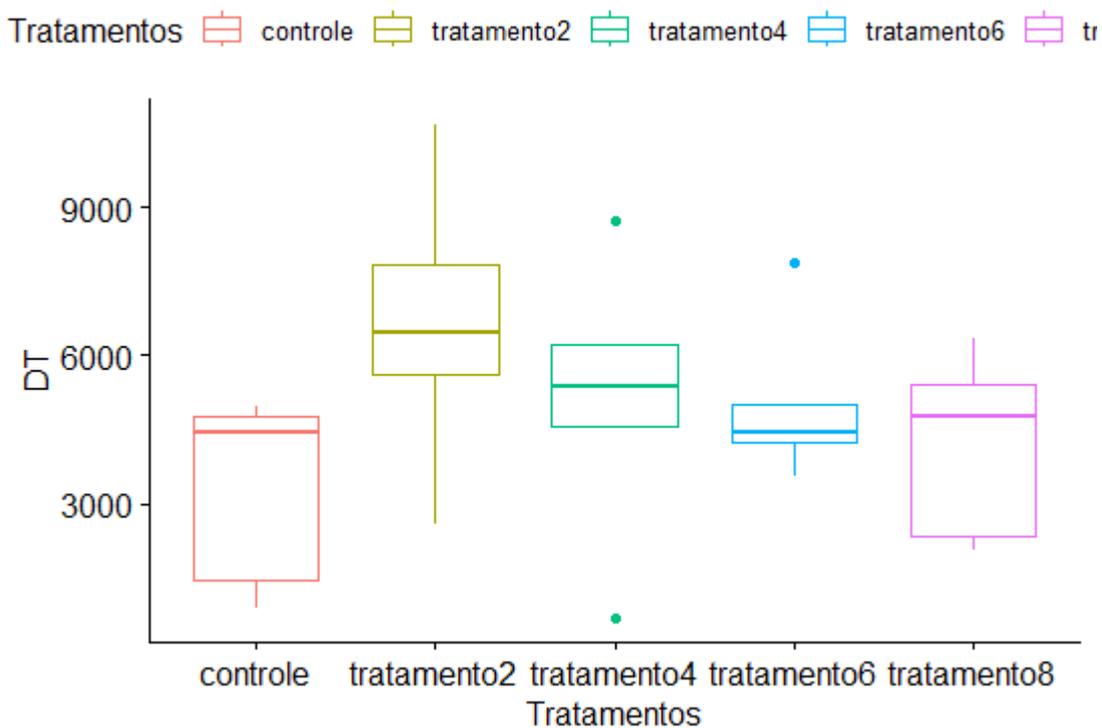


Figura 4 - Distância total (DT , em cm) percorrida por girinos de *A. catesbeiana* (eixo y) após exposição (96 h) a diferentes concentrações de cinzas (eixo x), em um total de uma hora de gravação.

Em média, a velocidade máxima de nado dos girinos (não diferiu significativamente entre as concentrações de cinzas ($0g=0,24 \pm 0,11$ m/s; $2g=0,23 \pm 0,32$ m/s, $4g=0,28 \pm 0,24$ /s, $g=0,64 \pm 0,19$ m/s, $8g= 0,78 \pm 1,5$ m/s; , média \pm desvio padrão; (Figura 5).

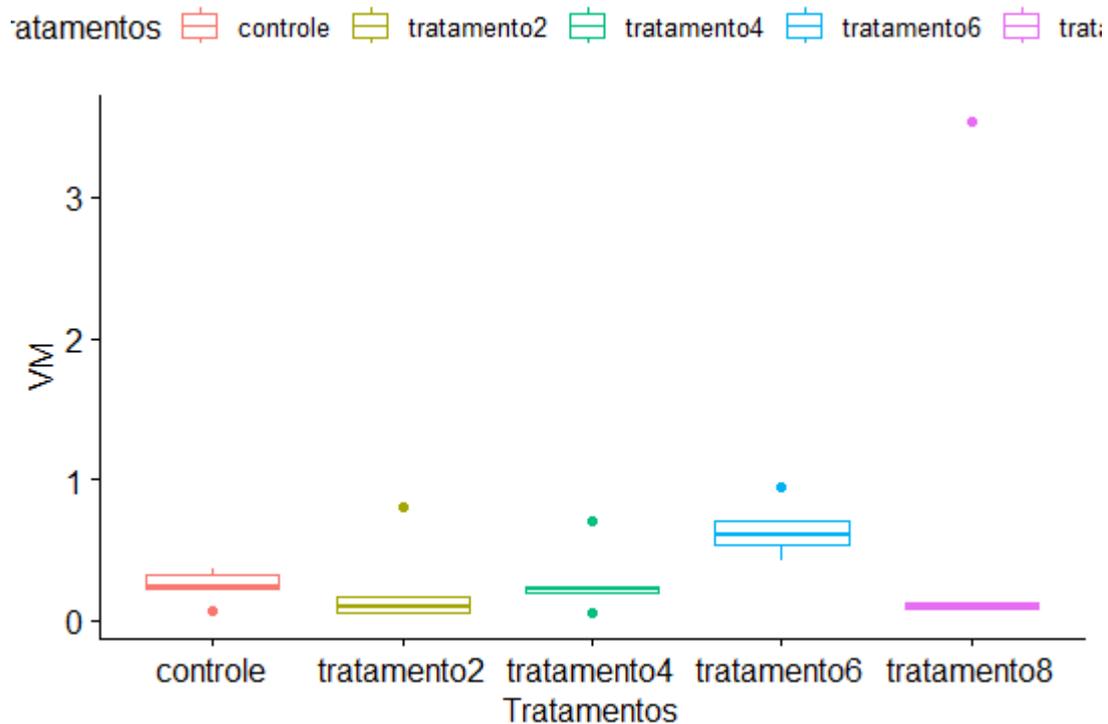


Figura 5 - Velocidade máxima (VM , em cm) atingida por girinos *A. catesbeiana* (eixo y) após exposição de 96 h a diferentes concentrações de cinzas (eixo x), em um total de uma hora de gravação.

5. DISCUSSÃO

Durante o experimento, não houve variação significativa nas respostas comportamentais dos girinos, indicando que sua capacidade de deslocamento permaneceu praticamente inalterada mesmo após a exposição às cinzas nos corpos d'água. Esse padrão sugere uma resistência da espécie às cinzas, o que poderia contribuir para a persistência da *A. catesbeiana* em ambientes afetados por incêndios. Essa resistência não apenas implica na tolerância aos poluentes presentes, mas também sugere que a espécie poderia efetivamente ocupar uma variedade de nichos ecológicos previamente ocupados por espécies nativas. Esse fenômeno reforça a consideração da *A. catesbeiana* como um potencial problema em termos de invasões biológicas, uma vez que as características avaliadas foram pouco afetadas pela presença do poluente, mas também pode suplantiar e substituir espécies autóctones em diferentes ecossistemas (Borges *et al.*, 2002; Lowe *et al.*, Ota, 2002).

Estudos realizados com peixes e cinzas de outras origens reportaram valores de LC50 menores do que 2g/L (p. ex., Gonino *et al.*, 2019). Além disso, usando cinzas oriundas da queima da vegetação de campos de altitude (mesma origem das cinzas aqui estudadas), Miguel (2023) encontrou um valor de CE50 (equivalente ao LC50) de 7,98 g/L para uma espécie de crustáceo (*Daphnia magna*), o qual é importante recurso alimentar para girinos e peixes destes ambientes. Um valor de LC50 para girinos de rã-touro maior que 15g/L, sugere uma grande resistência dessa espécie quando exposta à poluentes na água. Esta maior resistência à contaminação, realça o enorme potencial de invasão de *A. catesbeiana*. Dessa forma, eventos de fogo e a consequente contaminação da água por cinzas podem facilitar a introdução de espécies exóticas invasoras (Gonino *et al.*, 2019), por reduzir a diversidade de espécies, mais sensíveis à contaminação (Elton *et al.*, 1958; Kiesecker *et al.*, 1998), reduzindo a competição e facilitando o estabelecimento da invasora *A. catesbeiana*.

As características comportamentais dos animais são reconhecidas como respostas que variam entre os indivíduos de uma mesma população. Alguns indivíduos mostram maior tolerância e menor variação comportamental, enquanto outros são relativamente menos tolerantes e exibem mudanças mais significativas em seu comportamento (Sih, 2013; Polverino *et al.*, 2021). A ausência de alterações comportamentais após exposição às cinzas sugere que os girinos mantêm uma capacidade de deslocamento semelhante, independente da concentração de cinzas na água. A contaminação da água afeta grande parte da biodiversidade, levando a alteração no comportamento desses animais (Hansen & Roslev, 2016; Ren *et al.*, 2017; David *et al.*, 2012; Gonino *et al.*, 2019), tornando-os mais suscetíveis à predação. A manutenção da mobilidade dos girinos, mesmo expostos às cinzas, destaca a notável resistência de *A. catesbeiana*. Vasconcelos (2016) mostrou que a *A. catesbeiana* tem uma resistência maior que outros organismos a pesticidas precisando de uma dose maior do mesmo para ter efeitos comportamentais, porém ressalta a importância de mais pesquisas serem feitas, já que existe uma grande lacuna de conhecimento quando se trata de ecotoxicologia e seu efeito em anuro. Essa resistência pode representar uma vantagem adaptativa, especialmente em ambientes sujeitos a incêndios, principalmente pelo fato que a presença dessa espécie altera diretamente na predação e competição por alimento.

Aquarana catesbeiana está entre as cem espécies invasoras mais problemáticas do mundo (Cunha & Delariva, 2009). Caso estudos futuros avaliem a toxicidade de cinzas em espécies nativas de girinos e reportarem que concentrações mais baixas de cinzas têm o potencial de reduzir a sobrevivência, a velocidade e a capacidade natatória dessas espécies, isso poderia ter implicações significativas. Com a previsão de aumento na frequência de

incêndios devido às mudanças climáticas globais (Jones *et al.*, 2022; Burton *et al.*, 2023) e consequentemente, de ambientes aquáticos contaminados por cinzas, pode haver um cenário em que espécies sensíveis sejam localmente extintas, e espécies invasoras tolerantes, tais como *A. catesbeiana*, se beneficiem. Isso poderia resultar na expansão de sua área de distribuição em detrimento da biodiversidade nativa, devido à ocorrência mais frequente de incêndios.

A ausência de diferença na sobrevivência de girinos entre as concentrações de cinzas pode estar relacionada à alta mortalidade observada no grupo controle (sem adição de cinzas). Uma possível explicação para essa mortalidade alta é que os indivíduos expostos às cinzas possam tê-las ingerido como alimento, ao passo que os indivíduos no grupo de controle não foram alimentados durante a exposição aguda. A não-adição de alimentos durante o experimento foi um protocolo adotado para padronizar o estado alimentar dos organismos, uma vez que, com a presença das cinzas, os girinos poderiam ter uma capacidade reduzida de localizar o alimento oferecido nas diferentes unidades experimentais. Uma evidência que respalda essa hipótese é a detecção de cinzas nos estômagos dos indivíduos expostos às cinzas, sugerindo que esse poluente composto de matéria orgânica tenha sido ingerido e utilizado como fonte alimento (vídeo disponível em: <https://youtube.com/shorts/pX7NEIudTNs?feature=share>). Outros experimentos já evidenciaram a alimentação de anfíbios por toxinas como em Moura *et al* 2023, que demonstrou que a ingestão de toxinas pode afetar o comportamento mesmo de espécies antropofílicas como a *Scinax longilineus*.

6. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que *A. catesbeiana* é tolerante à contaminação de água por cinzas, uma vez que a sobrevivência, o deslocamento e a velocidade natatória são pouco (ou não são) impactados. Isso levanta preocupações crescentes, já que a notável resistência desses girinos a poluentes representa um indicador claro desse problema. As cinzas, que ainda são pouco estudadas como agentes tóxicos, podem representar uma ameaça a maior parte da biodiversidade local. Portanto, é crucial realizar pesquisas adicionais, especialmente no que diz respeito aos efeitos das cinzas na fisiologia desses animais. Enfatizamos ainda a importância de conduzir estudos utilizando espécies nativas de anuros para avaliar se existem diferenças comportamentais, isso nos permitirá comparar os dados aqui encontrados com os de espécies nativas, revelando o potencial de invasão de *A. catesbeiana*.

REFERÊNCIAS

Agus, C. *et al.* (2019). The Impact of Forest Fire on the Biodiversity and the Soil Characteristics of Tropical Peatland. In: Leal Filho, W., Barbir, J., Preziosi, R. (eds) Handbook of Climate Change and Biodiversity. Climate Change Management. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98681-4_18

Almeida, Priscilla Rennó; Rodrigues, Marcos Vinicius; Imperador, Adriana Maria. Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos de formulado comercial com princípio ativo glifosato em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae). Engenharia Sanitária e Ambiental, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 1115-1125, dez.2019.FapUNIFESP(SciELO). [tp://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522019166886](http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522019166886).

Allran JW, Karasov WH (2000) Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. Environ Toxicol Chem 19:2850–2855. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191133>.

Bishop, C. A.; Mahony, N. A.; J. Struger, P. Ng.; Pettit, K. E. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River Watershed, Ontario, Canada (1990 – 1992). Environmental Monitoring and Assessment, v. 57, p. 21–43, 1999.

Bixby, R. J.; Cooper, S. D.; Gresswell, R. E.; Brown, L. E.; Dahm, C. N.; Dwire, K. A. Fire effects on aquatic ecosystems: an assessment of the current state of the science. Freshwater Science, v. 34, n. 4, p. 1340–1350, 2015.

Blaustein, A. R.; Kiesecker, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. Ecology Letters, v. 5, p. 597-608, 2002.

Borges, R. E.; Santos, L. R. S.; Benvindo-Souza, M.; Modesto, R. S.; Assis, R. A.; Oliveira, C. Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the central Cerrado, Brazil. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, v. 77, n. 1, p. 22-28, 2019.. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>.

Cribb, Andre Yves. Manual técnico de ricultura. Brasília: Embrapa, 2013. 73 p.

Cruz-Esquivel A, Vilorio-Rivas J, Marrugo-Negrete J (2017) Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the SinA River, Colombia. *Environ Sci Pollut Res* 24:27392–27401

Cunha, E. R., & Delariva, R. L. (2009). Introdução Da Rã-Touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): Uma Revisão. *SaBios-Revista De Saúde E Biologia*, 4(2).

D'amore, A.; Hemingway, V.; Wasson, K. Do a threatened native amphibian and its invasive congener differ in response to human alteration of the landscape? *Biological Invasions*, v. 12, p. 145-154, 2010.

David, M.; Marigoudar, R. S.; Patil, K. V.; Halappa, R. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, n. 2, p. 127-134, 2012.

Earl, Stevan & Blinn, Dean. (2003). Effects of wildfire ash on water chemistry and biota in South-Western U.S.A. streams. *Freshwater Biology*. 48. 1015 - 1030. [10.1046/j.1365-2427.2003.01066.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01066.x).

Gonçalves, R.; Scholze, M.; Ferreira, A. M.; Martins, M.; Correia, A. D. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research*, v. 108, p. 205–213, 2008.

Gonino, Gabriel & Figueiredo, Bruno & Manetta, Gislaine & Zaia Alves, Gustavo & Benedito, Evanilde. (2019). Fire increases the productivity of sugarcane, but it also generates ashes that negatively affect native fish species in aquatic systems. *Science of The Total Environment*. 664. 215-221. 10.1016/j.scitotenv.2019.02.022.

Govindarajulu, P.; Price, W. S.; Anholt, B. R. Introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Western Canada: has their ecology diverged? *Journal of Herpetology*, v. 40, p. 249-260, 2006.

Hansen, L. R.; Roslev, P. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, v. 179, p. 36–43, out. 2016.

Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjuoa Y, Parker J (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and Amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114:40–50

Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M (2010) The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J Exp Biol* 213:921–933

Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.C. e Foster, M.S. 1994. Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington.

IUNC International Union for Conservation of Nature. 100 of the world's worst invasive alien species. Invasive Species Specialist Group, Auckland, New Zealand, 2003.

Jones, M. W. *et al.* Global and Regional Trends and Drivers of Fire Under Climate Change. *Reviews of Geophysics* 60, (2022).

Kiesecker, J. M.; Blaustein, A. R. Effects of introduced bullfrogs and smallmouth bass on microhabitat use, growth, and survival of native red-legged frogs (*Rana aurora*). *Conservation Biology*, v. 12, p. 776-787, 1998.

Kloster, S. & Lasslop, G. Historical and future fire occurrence (1850 to 2100) simulated in CMIP5 Earth System Models. *Glob Planet Change* 150, (2017).

Lowe, S.; Browne, M.; Boudjelas, S.; Depoorter, M. 100 of the world 's worst invasive worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database, 2000. ISSG, SSC & IUCN Disponível em: www.issg.org/booklet.

Luedtke, J.A., Chanson, J., Neam, K. et al. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature* 622, 308–314 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>

Mann, M. R.; Hyne, R. V.; Choung, C. B.; Wilson, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 2903–2927, 2009.

Marchand, G., Demuynck, S., Slaby, S. et al. Adverse effects of fly ashes used as immobilizing agents for highly metal-contaminated soils on *Xenopus laevis* oocytes survival and maturation—a study performed in the north of France with field soil extracts. *Environ Sci Pollut Res* 27: 3706–3714 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04560-0>.

Minshall, G. & Royer, Todd & Robinson, Christopher. (1994). Stream Ecosystem Responses to Fire: The First Ten Years. After the Fires The Ecology of Change in Yellowstone National Park. 165-188. 10.12987/yale/9780300100488.003.0008.

Miranda, Heloisa & Bustamante, Mercedes & Miranda, Antonio. (2002). 4. The Fire Factor: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna. 10.7312/oliv12042-003.

Moura, S., Kloh, J., Figueredo, C., & Eterovick, P. C. (2023). An empty stomach is not a good adviser: avoiding toxic Cyanobacteria can compromise tadpole antipredator defenses. *Amphibia-Reptilia* (published online ahead of print 2023). <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10153>

Neary, Daniel G.; Ryan, Kevin C.; DeBano, Leonard F., eds. 2005. (revised 2008). Wildland fire in ecosystems: effects of fire on soils and water. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-42-vol.4. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 250 p.

Nicholas.J; Aaron M. Ellison: Princípios de Estatística em Ecologia. São Paulo: Artmed, 2010. 532 p.

Ota, H. Bullfrog *Rana catesbeiana*. In: Handbook of Alien Species in Japan (ed. the Ecological Society of Japan), 2002. p. 106.

Polverino G, Martin JM, Bertram MG, Soman VR, Tan H, Brand JA, Mason RT, Wong BBM. 2021. Psychoactive pollution suppresses individual differences in fish behaviour. *Proc Biol Sci.* 10;288(1944):20202294.

Ren, Q. et al. The Role of AChE in Swimming Behavior of *Daphnia magna*: Correlation Analysis of Both Parameters Affected by Deltamethrin and Methomyl Exposure. *Journal of Toxicology*, v. 2017, p. 1–11, 19 out. 2017.

Rogers BM, Balch JK, Goetz SJ, et al (2020) Focus on changing fire regimes: interactions with climate, ecosystems, and society. *Environ Res Lett* 15:030201. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab6d3a>.

Ryan, M. J The reproductive behavior of the bullfrog (*Rana catesbeiana*), *Copeia*, Washington, v.1 p. 108-114, 1980.

Santos, D., Abrantes, N., Campos, I., Domingues, I., Lopes, I. Effects of aqueous extracts of wildfire ashes on tadpoles of *Pelophylax perezi*: Influence of plant coverage, *Science of The Total Environment*, Volume 854, 2023, 158746, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158746>.

Schiesari, L.; Grillitsch, B.; Grillitsch, H. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. *Conservation Biology*, v. 21, n. 2, p. 465–471, 2007.

Seixas Filho, J.T., Oliveira, M.G.A., Navarro, R.D., Garcia, S.L.R., Moura, G. De S.B E Ribeiro Filho, O.P. Atividades enzimáticas de girinos de rã-touro submetidos a rações com níveis de proteína. *Archivos de Zootecnia*, v. 60, n. 232, p. 1161-1170, 2011b.

Shailesh Tawade, Rinku R. Choudhary and Vaishnavi Santosh Chavan (2022); Effects of forest fire on forest ecosystem, biodiversity and loss of plant and animal species *Int. J. of Adv. Res.* 10 (Jun). 597-600] (ISSN 2320-5407).

Sih, A. 2013. Understanding variation in behavioural responses to human-induced rapid environmental change: a conceptual overview. *Animal Behaviour*, 85, 5, p. 1077-1088.

Smith, Hugh G., et al. “Wildfire effects on water quality in forest catchments: A review with implications for water supply”. *Journal of Hydrology*, vol. 396, no 1, janeiro de 2011, p. 170–92. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.10.043>.

Stuart, S. N.; Chanson, J. S.; Cox, N. A.; Young, B. E.; Rodrigues, A. S. L.; Fischman, D. L.; Waller, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, New York, v. 306, p. 1783-1786. 2004.

Tokiwa T, Kadokaru S, Ito M, Yoshida M, Une Y (2015) Oxalate nephropathy in free-living American bullfrog tadpoles. *Dis Aquat Org* 116:199-203. <https://doi.org/10.3354/dao02936>

Vasconcelos, A.M., Daam, M.A., dos Santos, L.R.A. et al. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. *Ecotoxicology* 25, 500–509 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1608-4>

Whitney, J. E., K. B. Gido, T. J. Pilger, D. L. Propst, and T. F. Turner. 2015. Consecutive wildfires affect stream biota in cold- and warmwater dryland river networks. *Freshwater Science* 34:1510–1526.

Wolkowicz, I. R. H.; Aronzon, C. M.; Coll, C. S. P. Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *Journal of Hazardous Materials*, v. 263, p. 784-791, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.018>.