



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Beatriz Pellis

**Influência de diferentes regimes de flutuação diária de temperatura em
respostas bioquímicas, histológicas, genotóxicas e imunológicas de girinos de
Boana faber expostos a agrotóxicos de rizicultura**

Florianópolis

2025

Beatriz Pellis

Influência de diferentes regimes de flutuação diária de temperatura em respostas bioquímicas, histológicas, genotóxicas e imunológicas de girinos de *Boana faber* expostos a agrotóxicos de rizicultura

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Florianópolis

2025

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Pellis, Beatriz

Influência de diferentes regimes de flutuação diária de temperatura em respostas bioquímicas, histológicas, genotóxicas e imunológicas de girinos de *Boana faber* expostos a agrotóxicos de rizicultura / Beatriz Pellis ; orientador, Eduardo Alves de Almeida, 2025.

114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Ecotoxicologia. 3. Anfíbios. 4. Mudanças climáticas. 5. Agrotóxicos. I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. III. Título.

Beatriz Pellis

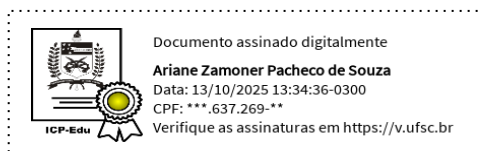
Influência de diferentes regimes de flutuação diária de temperatura em respostas bioquímicas, histológicas, genotóxicas e imunológicas de girinos de *Boana faber* expostos a agrotóxicos de rizicultura

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 2 de setembro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

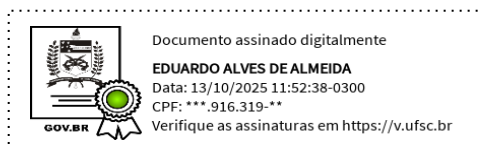
Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Universidade do Estado de Santa Catarina
Karim Hahn Luchmann, Dra.

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Eduardo Alves de Almeida, Dr. Orientador

Florianópolis, 2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero expressar minha gratidão pela oportunidade de realizar meu mestrado em uma universidade de excelência. Foi uma experiência incrível ser mestranda no **Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFSC**, onde conheci pessoas inspiradoras e vivenciei momentos muito especiais.

Agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Eduardo Alves de Almeida**, por todo o apoio desde o momento em que entrei no CETAq. Sua orientação, incentivo e conselhos sobre a vida acadêmica foram fundamentais para que eu enfrentasse os momentos de ansiedade ao longo desses dois anos de mestrado. Muito obrigada por acreditar no meu potencial e me motivar a sempre dar o meu melhor.

À equipe do **CETAq** e a todos que compartilharam comigo o dia a dia no laboratório, meu sincero agradecimento. Esta dissertação não teria sido a mesma sem a colaboração de cada um de vocês. Em especial, sou grata aos meus amigos **Mara, Nicole, Aline, Camila e Gustavo**, que além de me auxiliarem no laboratório, também tornaram os momentos difíceis mais leves com nossas conversas e risadas. Também quero agradecer ao **Lucca**, amigo da minha turma de mestrado, pela amizade e apoio. É sempre bom estar com vocês!

Agradeço à **Daiane**, ao **Rony** e ao **Prof. Luís Giasson** por me acompanharem até Rio dos Cedros para a coleta dos girinos. A presença de vocês fez toda a diferença.

À **Isabella**, bolsista de Iniciação Científica, sou grata pelo auxílio dedicado nas análises sanguíneas, contribuindo significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Daina** e ao **Prof. Danilo**, obrigada pelos ensinamentos e por não medirem esforços para responder às muitas dúvidas que surgiram durante as análises estatísticas.

À **Prof. Cláudia** e à **Elizia**, agradeço pelo suporte e por todo o aprendizado na área da histologia, que foi essencial para este trabalho.

Ao **Rodrigo**, agradeço por sempre me apoiar e cuidar de mim nos momentos mais difíceis. Sua presença na minha vida foi essencial para eu conseguir seguir firme durante todo o mestrado. Muito obrigada pela parceria e por todo o amor e carinho!

Aos meus pais, **Cheila e Fabio**, agradeço por tornarem possível a realização de um intercâmbio acadêmico que mudou a minha trajetória profissional e me permitiu descobrir minha paixão pela Ecotoxicologia. Sem essa experiência, eu não estaria onde estou hoje.

À minha vó **Ondina**, minha oma **Daise** e meu opa **Nilson**, obrigada por todo o amor e apoio durante essa fase tão importante da minha vida.

Ao meu irmão **Pietro**, agradeço pelo companheirismo e por ser a melhor pessoa que eu conheço. Te amo!

À Universidade Regional de Blumenau (**FURB**) e ao Herbário Dr. Roberto Miguel Klein, agradeço pela infraestrutura e pelos equipamentos disponibilizados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (**LARP**) da Universidade Federal de Santa Maria (**UFSM**), sou grata pela realização das análises químicas da água, que foram essenciais para este trabalho.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de mestrado, à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (**FAPESC**) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo apoio financeiro.

*“A ciência tem grandes inimigos:
a ignorância e aqueles que lucram com ela”*

Rachel Carson

RESUMO

O aumento da atividade agrícola e as mudanças climáticas contribuem significativamente para o declínio de populações de anfíbios. Esses vertebrados são particularmente sensíveis a perturbações ambientais, o que os torna o grupo mais ameaçado de extinção globalmente. Entre os principais estressores está o uso intensivo de agrotóxicos, que poluem os corpos d'água e comprometem a homeostase de girinos. Esse comprometimento é agravado em condições de altas temperaturas, que aceleram reações químicas e biológicas, intensificando a toxicidade e a absorção de xenobióticos. Diante da escassez de estudos com misturas de poluentes e oscilações térmicas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de flutuações diárias de temperatura em girinos de *Boana faber* expostos a uma mistura de agrotóxicos de rizicultura em concentrações ambientalmente realísticas. Os animais, no estágio 28 de Gosner, foram expostos durante 16 dias a uma mistura de herbicidas (bentazona, quincloraque, penoxsulam, imazapique e fenoxaprop-P-etílico), inseticidas (cipermetrina e clorantpriliprole) e fungicidas (tebuconazol e azoxistrobina) sob dois regimes de temperatura com variações de 25 °C-28 °C e 25 °C-34 °C. Amostras de vísceras, cabeça e músculo foram coletadas para análises bioquímicas, histológicas, genotóxicas e imunológicas, visando avaliar o impacto causado na saúde dos girinos em diferentes níveis biológicos. A mistura dos agrotóxicos reduziu o comprimento da cauda, o número de basófilos, a atividade da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e os níveis de malondialdeído (MDA), enquanto aumentou as proteínas carboniladas (PC) e a acetilcolinesterase (AChE) muscular. Já nas maiores oscilações térmicas houve aceleração do estágio de desenvolvimento, ganho de peso e comprimento total, aumento da SOD, AChE muscular, número de núcleos lobados, células anucleadas e eosinófilos, enquanto as PC e os basófilos reduziram. As maiores flutuações de temperatura interagiram com as maiores concentrações dos agrotóxicos, afetando a atividade da SOD e da GPx. As enzimas glutathione S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e carboxilesterase (CbE) não sofreram alterações significativas, assim como os parâmetros histológicos do fígado e da glândula interrenal. Desse modo, conclui-se que a exposição a uma mistura de agrotóxicos em concentrações ambientalmente realísticas sob flutuações térmicas diárias, comprometeu a homeostase dos girinos de *Boana faber*. Além disso, tanto os agrotóxicos quanto as variações térmicas, isoladamente, também foram capazes de provocar alterações fisiológicas, imunológicas e bioquímicas nos girinos, reforçando a importância de se considerar interações entre multiestressores ambientais em estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: anfíbios; agrotóxicos; oscilações térmicas; biomarcadores.

ABSTRACT

The intensification of agricultural activities and climate change have significantly contributed to the decline of amphibian populations. These vertebrates are particularly sensitive to environmental disturbances, making them the most threatened group of vertebrates worldwide. Among the main stressors is the intensive use of pesticides, which pollute aquatic ecosystems and disrupt the homeostasis of tadpoles. This disruption is exacerbated under high-temperature conditions, which accelerate chemical and biological reactions, increasing the toxicity and absorption of xenobiotics. Given the scarcity of studies involving pollutant mixtures and thermal fluctuations, this study aimed to evaluate the influence of daily temperature fluctuations on *Boana faber* tadpoles exposed to a mixture of rice-field pesticides at environmentally realistic concentrations. The animals at Gosner stage 28 were exposed for 16 days to a mixture of herbicides (bentazon, quinclorac, penoxsulam, imazapic, and fenoxaprop-P-ethyl), insecticides (cypermethrin and chlorantraniliprole), and fungicides (tebuconazole and azoxystrobin), under two temperature regimes ranging from 25-28 °C and 25-34 °C. Samples of viscera, head, and muscle were collected for biochemical, histological, genotoxic, and immunological analyses, aiming to assess health impacts at multiple levels of biological organization. The pesticide mixture decreased tail length, basophil counts, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) activities, and malondialdehyde (MDA) levels, while increasing carbonylated proteins (PC) and muscular acetylcholinesterase (AChE). Greater thermal fluctuations accelerated the developmental stage, enhanced body mass and total length, and increased SOD activity, muscular AChE, lobed nuclei, anucleated cells, and eosinophils, whereas PC levels and basophil counts decreased. The strongest thermal fluctuations interacted with the highest pesticide concentrations, affecting SOD and GPx activities. No significant alterations were observed in glutathione S-transferase (GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), or carboxylesterase (CbE), nor in the histological parameters of the liver and interrenal gland. In conclusion, exposure to an environmentally realistic pesticide mixture under daily temperature fluctuations disrupted the homeostasis of *Boana faber* tadpoles. Moreover, both pesticides and thermal variations, even when acting independently, were capable of inducing physiological, immunological, and biochemical alterations, highlighting the importance of considering interactions between multiple environmental stressors in ecotoxicological studies.

Keywords: amphibians; pesticides; temperature fluctuations; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de ocorrência da espécie <i>Boana faber</i>	28
Figura 2 - (A) Girino no estágio Gosner 28; (B) adulto; e (C) ninho de <i>Boana faber</i>	29
Figura 3 - Processos de biotransformação	31
Figura 4 - Aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em intoxicações.....	32
Figura 5 - Sistema de defesa antioxidante	33
Figura 6 - Formação de malondialdeído (MDA) através da peroxidação lipídica.	34
Figura 7 - Ação da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	35
Figura 8 - Processos metamórficos em anfíbios.....	40
Figura 9 - Local de coleta dos girinos.....	46
Figura 10 - Fluxograma do delineamento experimental.	47
Figura 11 - Pontos de coleta de água.....	48
Figura 12 - <i>Data logger</i> medindo a temperatura dos grupos experimentais.....	50
Figura 13 - Caracterização das anormalidades nucleares de eritrócitos observados em girinos de <i>Boana faber</i>	59
Figura 14 - Leucócitos presentes no sangue dos girinos de <i>Boana faber</i>	60
Figura 15 - Médias das temperaturas dos aquários.	62
Figura 16 - Efeito da temperatura no estágio de desenvolvimento (A), ganho de peso (B) e comprimento total (C) dos girinos após 16 dias de experimento	64
Figura 17 - Efeito da mistura dos agrotóxicos no comprimento da cauda dos girinos.	65

Figura 18 - Efeito da temperatura nos níveis de proteínas carboniladas das vísceras (A) e na atividade da AChE no músculo (B)	66
Figura 19 - Efeito da mistura dos agrotóxicos na atividade da GR (A), MDA (B) e proteínas carboniladas (C) nas vísceras; e da AChE no músculo (D).....	67
Figura 20 - Efeito de interação nas enzimas SOD (A) e GPx (B)	68
Figura 21 - Fotomicrografias do tecido hepático de girinos de <i>Boana faber</i> expostos a uma mistura de agrotóxicos e a diferentes oscilações diárias de temperatura durante 16 dias.....	70
Figura 22 - Fotomicrografias do tecido renal de girinos de <i>Boana faber</i> expostos a uma mistura de agrotóxicos e a diferentes oscilações diárias de temperatura durante 16 dias.....	71
Figura 23 - Efeito da temperatura na frequência de células anucleadas (A) e de eritrócitos com núcleo lobado (B) em uma contagem de 1000 eritrócitos	72
Figura 24 - Efeito da temperatura no número de eosinófilos (A) e basófilos (B) em uma contagem de 100 leucócitos.....	73
Figura 25 - Efeito da mistura dos agrotóxicos no número de basófilos em uma contagem de 100 leucócitos.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Informações sobre os agrotóxicos utilizados neste estudo. As classificações toxicológicas da ANVISA e do IBAMA são baseadas nas formulações comerciais dos agrotóxicos	26
Quadro 2 - Anormalidades observadas em eritrócitos	37
Quadro 3 - Células sanguíneas observadas no sangue dos girinos e suas principais funções.....	39
Quadro 4 - Métodos utilizados para as análises bioquímicas.....	52
Quadro 5 - Resumo dos resultados obtidos neste estudo	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos encontrados em áreas adjacentes à rizicultura	49
Tabela 2 - Concentrações dos agrotóxicos detectadas na água dos aquários	63
Tabela 3 - Estágio de desenvolvimento, peso, comprimento total e da cauda no tempo inicial e final do experimento	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

AChE Acetilcolinesterase

AcChI Iodeto de acetiltioacolina

ANA Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico

ANOVA Análise de variância

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT Hidroxitolueno butilado

C Controle (grupo não exposto à mistura de agrotóxicos)

CAT Catalase

CbE Carboxilesterase

CDNB 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

cm Centímetro(s)

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNPH 2,4-dinitrofenil-hidrazina

DTT DL-ditiotreitol

DTNB 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)

EDC Químico disruptor endócrino

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ENAs Anormalidades nucleares eritrocitárias

EPA United States Environmental Protection Agency

EROs Espécies reativas de oxigênio

g Unidade de força centrífuga aplicada

GPx Glutathione peroxidase

GR Glutathione reductase

GSH Glutathione em sua forma reduzida

GSSG Glutationa em sua forma oxidada

GST Glutationa-S-transferase

G6P Glicose-6-fosfato

G6PDH Glicose-6-fosfato desidrogenase

H maior concentração da mistura de agrotóxicos (*high concentration*)

h Hora(s)

HCl Ácido clorídrico

H₂O Água

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

INCA Instituto Nacional de Câncer

KCl Cloreto de potássio

L menor concentração da mistura de agrotóxicos (*low concentration*)

L Litro(s)

Log K_{ow} Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água

M Molar

MDA Malondialdeído

mg Miligrama(s)

MgCl₂ Cloreto de magnésio

min Minuto(s)

mL Mililitro(s)

mM Milimolar

MN Micronúcleo

mU Miliunidade de enzima

n Número amostral

nm Nanômetro

nmol Nanomol

NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NIH National Library of Medicine

O₂ Oxigênio molecular

O₂^{•-} Ânion superóxido

pH Potencial hidrogeniônico

PhE Feniltioacetato

pK_a Constante de dissociação ácida

•OH Radical hidroxil

PMSF Fluoreto de fenil metano sulfonil

RS Rio Grande do Sul

SC Santa Catarina

SDS Dodecil sulfato de sódio

SISBIO Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SOD Superóxido dismutase

SOSBAI Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado

T₃ Triiodotironina

T₄ Tiroxina

TBA Ácido tiobarbitúrico

TCA Ácido tricloroacético

TH Hormônios da tireoide

TMP 1,1,3,3-Tetrametoxipropano

TRIS 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

U Unidade de enzima (μmol de produto formado ou substrato consumido por unidade de tempo)

μg Micrograma(s)

μL Microlitro(s)

μM Micromolar

°C Grau(s) Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 DECLÍNIO DAS POPULAÇÕES DE ANFÍBIOS, POLUIÇÃO AMBIENTAL E MUDANÇAS CLIMÁTICAS	20
1.2 AGROTÓXICOS DO ARROZ IRRIGADO	23
1.3 <i>Boana faber</i> COMO MODELO DE ESTUDOS EM ECOTOXICOLOGIA	28
1.4 INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	30
1.4.1 Parâmetros bioquímicos	31
1.4.2 Parâmetros histológicos	35
1.4.3 Parâmetros genotóxicos	36
1.4.4 Parâmetros imunológicos	38
1.5 EFEITOS DOS AGROTÓXICOS E DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3. HIPÓTESES.....	44
4. METODOLOGIA	45
4.1 COLETA DOS GIRINOS EM CAMPO.....	45
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
4.3 ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA	51
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	52
4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	57
4.6 ANÁLISES GENOTÓXICAS E IMUNOLÓGICAS	58
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	60
5. RESULTADOS	61
5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	61

5.2 FLUTUAÇÃO DIÁRIA DA TEMPERATURA DOS AQUÁRIOS	61
5.3 ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA DOS AQUÁRIOS	62
5.4 ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO E PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	63
5.4.1 Efeitos da temperatura	64
5.4.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos	65
5.4.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura de agrotóxicos	65
5.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	66
5.5.1 Efeitos da temperatura	66
5.5.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos	67
5.5.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura dos agrotóxicos	68
5.6 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	69
5.7 PARÂMETROS GENOTÓXICOS.....	72
5.7.1 Efeitos da temperatura	72
5.7.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos	72
5.7.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura dos agrotóxicos	73
5.8 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	73
5.8.1 Efeitos da temperatura	73
5.8.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos	74
5.8.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura dos agrotóxicos	74
5.9 SÍNTESE DOS RESULTADOS	74
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICE A – Gráficos das análises sem efeito significativo de interação ...	103
ANEXO A – Autorização do SISBIO para a coleta dos girinos	108

ANEXO B - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (FURB) 112

ANEXO C – Estágios de desenvolvimento de Gosner 113

1. INTRODUÇÃO

1.1 DECLÍNIO DAS POPULAÇÕES DE ANFÍBIOS, POLUIÇÃO AMBIENTAL E MUDANÇAS CLIMÁTICAS

A classe dos anfíbios é composta por três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cecílias) (Wake; Koo, 2018). Entre essas, os anuros são o grupo mais estudado, com 8.899 espécies descritas globalmente (Frost, 2025), das quais 1.144 espécies ocorrem no Brasil (Segalla *et al.*, 2021). Apesar disso, os anfíbios são os vertebrados mais ameaçados de extinção no planeta, com 41% das espécies em algum grau de ameaça (IUCN, 2024). O seu declínio populacional é atribuído a uma combinação de fatores que têm sido agravados por atividades antropogênicas, incluindo a destruição de habitat, introdução de espécies exóticas, aumento da radiação UV-B, doenças infecciosas, poluição ambiental e mudanças climáticas (Costa *et al.*, 2023; Scheele *et al.*, 2019; Wake; Koo, 2018; Collins, 2010).

A fragmentação de habitat, por exemplo, intensifica a competição por recursos e favorece espécies invasoras, sendo que a taxa de sobrevivência das espécies nativas diminui com o aumento de predação e/ou a presença de parasitas (Bradley *et al.*, 2019; Collins, 2010). Além disso, a perda de vegetação natural e a modificação do habitat favorecem a ação de patógenos, como o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, causador da quitridiomicose. Esse patógeno se adere à pele dos anfíbios, comprometendo sua respiração e funções fisiológicas, sendo uma das principais causas do declínio de espécies de anuros (Moon, 2018; Becker *et al.*, 2017). A pele altamente permeável e o ciclo de vida bifásico, que inclui estágios aquáticos e terrestres, resultam em maior exposição e absorção de xenobióticos pelos anfíbios (Hartel; Von Wehrden, 2013; Hayes *et al.*, 2006). Há registros de alterações comportamentais, morfológicas, histológicas, bioquímicas, imunológicas, genotóxicas, no desenvolvimento e na reprodução desses animais frente a estressores ambientais (Bitschinski *et al.*, 2024; Dos Santos *et al.*, 2024; Warsneski *et al.*, 2024; Robinson *et al.*, 2021).

Poluentes presentes no ambiente frequentemente interagem de maneira sinérgica, aumentando a toxicidade e os efeitos nocivos aos organismos (Costa *et al.*, 2023). Diversos ecossistemas naturais e organismos não-alvo sofrem grandes impactos negativos devido ao aumento da atividade agrícola (Freitas *et al.*, 2017). Os agrotóxicos utilizados são usualmente carregados para corpos hídricos, causando a contaminação de ambientes naturais (Silva *et al.*, 2009). Segundo Chapman (2007), contaminantes são substâncias encontradas em concentrações acima do nível natural ou em locais onde não deveriam estar presentes. Quando essas substâncias causam efeitos tóxicos aos organismos, são classificadas como poluentes (Chapman, 2007).

Assim como a poluição ambiental, as mudanças climáticas impulsionadas principalmente por atividades humanas, têm provocado impactos cada vez mais intensos para a humanidade e a vida no planeta. A principal causa do aquecimento global é a emissão de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera, resultante da queima de combustíveis fósseis, como carvão, petróleo e gás natural. Outras atividades humanas, como a agricultura, o desmatamento e os processos industriais intensificam a crise climática (National Academy of Sciences, 2010).

Além do aquecimento global, as mudanças climáticas desencadeiam uma série de consequências, como a acidificação dos oceanos, aumento do nível do mar, maior vulnerabilidade de áreas costeiras, escassez de água doce, perda da biodiversidade, ameaças à saúde pública e impactos na segurança alimentar. A mitigação desses efeitos exige transformações rápidas e estruturais nas sociedades. Entre as principais estratégias estão a redução do desmatamento legal e ilegal, o combate aos crimes ambientais, a interrupção da exploração de petróleo e aceleração da transição para fontes de energias renováveis e mais sustentáveis, o incentivo à agricultura e pecuária de baixo carbono, além do desenvolvimento de políticas de adaptação climática que contribuam para a redução das desigualdades sociais (Whitmarsh *et al.*, 2021; Dietz *et al.*, 2020; National Academy of Sciences, 2010).

A crise climática atual representa uma grande ameaça para a biodiversidade (Orr *et al.*, 2020), podendo interferir nas respostas biológicas dos organismos e torná-los mais suscetíveis a efeitos de poluentes ambientais antropogênicos (Verheyen *et al.*, 2022). Temperaturas mais elevadas aceleram reações químicas e biológicas, podendo intensificar a toxicidade dos poluentes, além de favorecer a sua absorção devido ao aumento do metabolismo basal e da permeabilidade das membranas biológicas (Noyes; Lema, 2015; Hooper *et al.*, 2012; Middlebrooks *et al.*, 1973). Como consequência, a necessidade energética dos organismos aumenta, reduzindo a energia disponível para mecanismos de defesa e reparação, tornando-os mais vulneráveis (Hallman; Brooks, 2015).

Os microhabitats utilizados pelos anuros para reprodução estão sujeitos a variações ambientais significativas, como alterações na temperatura, no nível da água, na disponibilidade de alimento e na presença de predadores (Eterovick *et al.*, 2010). Muitas espécies se reproduzem em lagos rasos ou poças, onde os efeitos das altas temperaturas e suas flutuações ao longo do dia são intensificados pela perda de cobertura vegetal e pelo aumento da incidência solar decorrente do desmatamento (Pounds *et al.*, 2007). Com a elevação da temperatura, há um aumento nas taxas metabólicas e uma possível aceleração da metamorfose, um processo com duração limitada e dependente da época do ano, o que pode levar à girinos atingindo a fase adulta com menor conteúdo energético e maior suscetibilidade a xenobióticos (Laurila *et al.*, 2001; Atkinson, 1994).

A sazonalidade resulta em diferentes ciclos de flutuação térmica da água, em que os períodos mais quentes do ano apresentam oscilações diárias mais acentuadas em comparação aos períodos mais amenos. Essas variações afetam diretamente a toxicidade dos poluentes aquáticos, em que a temperatura da água exerce maior ou menor influência dependendo da época do ano (Verheyen *et al.*, 2022). Desse modo, a dinâmica e os efeitos tóxicos desses compostos podem variar substancialmente para os anfíbios entre dias com maiores ou menores flutuações térmicas. Independentemente das condições do

habitat, a temperatura é um fator abiótico determinante, capaz de influenciar o desenvolvimento, metabolismo e comportamento de animais ectotérmicos, como os anfíbios (Freitas *et al.*, 2017).

A maior parte dos estudos sobre os efeitos térmicos na toxicidade de poluentes utilizam delineamentos experimentais em que as temperaturas são mantidas constantes durante o período de exposição. No entanto, essas condições não representam de forma adequada o contexto ambiental, onde a temperatura da água aumenta gradativamente ao longo do dia e diminui durante a noite. Verheyen *et al.* (2022) demonstraram que as flutuações diárias de temperatura podem ser mais deletérias aos animais do que temperaturas elevadas constantes, devido aos diferentes padrões de resposta biológica e de comportamento dos poluentes em função da temperatura.

Em ambientes mais quentes, os organismos tendem a absorver mais agrotóxicos, aumentando a demanda metabólica e o custo energético. Por outro lado, em temperaturas mais baixas, a degradação e a eliminação dos agrotóxicos são reduzidas, uma vez que os organismos dispõem de menos energia para investir em mecanismos de detoxificação e reparação (Verheyen *et al.*, 2022). No entanto, ainda são escassos os estudos que consideram a influência das oscilações térmicas diárias em seu delineamento experimental, com o intuito de reproduzir um cenário mais realístico com as condições climáticas atuais, especialmente simulando diferentes regimes de flutuações de temperatura.

1.2 AGROTÓXICOS DO ARROZ IRRIGADO

O arroz é um dos cereais mais cultivados e consumidos globalmente. Sua produção está fortemente associada ao uso intensivo de diversos agrotóxicos para garantir a produtividade dos cultivos e atender à demanda crescente por alimentos (SOSBAI, 2022; Soares *et al.*, 2020). No entanto, essa prática tem causado impactos ambientais significativos, amplificados pela flexibilização da

legislação nacional sobre o uso desses produtos (Costa *et al.*, 2023; Nunes *et al.*, 2021; Hedlund *et al.*, 2020). Estima-se que o seu uso irá aumentar mais rápido do que o crescimento da população, apesar dos grandes impactos ambientais causados com o aumento da atividade agrícola (Costa *et al.*, 2023; Hedlund *et al.*, 2020).

O Brasil ocupa a 9ª posição entre os maiores produtores de arroz no planeta, sendo este o sexto produto de origem vegetal mais cultivado no país (EMBRAPA, 2025; FAOSTAT, 2022). Entre os países do Mercosul, o Brasil é o principal produtor de arroz, contribuindo com cerca de 78% da produção total da região (SOSBAI, 2022). De acordo com a Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (2022), a produção anual brasileira varia entre 11 e 13 milhões de toneladas, concentrando-se majoritariamente nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC).

Essa elevada produtividade tem um custo ambiental e de saúde pública, uma vez que o uso intensivo de agrotóxicos representa riscos potenciais para trabalhadores rurais, consumidores e organismos não-alvo (INCA, 2022; Rigotto *et al.*, 2014; Ecobichon, 2001). Além disso, o método predominante de cultivo é o sistema de arroz irrigado, caracterizado pela ausência de rotação de culturas e pela semeadura em solo seco seguida de irrigação por inundação (EMBRAPA, 2023). Esse sistema favorece o transporte de agrotóxicos para corpos hídricos, contaminando ambientes naturais, além do arroz ser o maior consumidor de água no Brasil em termos agrícolas (ANA, 2024; Silva *et al.*, 2009). Nesse contexto, o presente estudo analisou os impactos de uma mistura de agrotóxicos amplamente utilizados na rizicultura em SC. Os agrotóxicos foram selecionados para o estudo baseado em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa onde amostras de água de ambientes aquáticos, próximos de áreas de rizicultura da cidade de Massaranduba (SC) foram analisadas, tendo sido encontrados os compostos listados no Quadro 1 (Bitschinski *et al.*, 2024; Warsneski *et al.*, 2024).

O Brasil é o maior consumidor global de agrotóxicos (Soares *et al.*, 2020). No âmbito regulatório, a Resolução-RE nº 2.080, de 31 de julho de 2019 implementa uma nova classificação toxicológica para agrotóxicos, separando-os

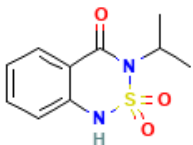
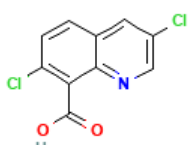
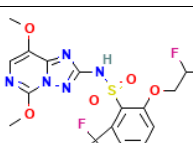
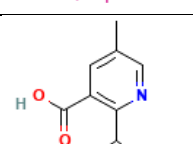
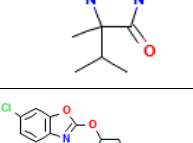
em cinco categorias: (1) Extremamente tóxico; (2) Altamente tóxico; (3) Moderadamente tóxico; (4) Pouco tóxico; e (5) Improvável de causar dano agudo. Além de incluir o item “Não classificado” para os agrotóxicos considerados de baixíssimo risco (ANVISA, 2019). Já a classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental proposta pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) no Art. 3º da Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996 classifica os agrotóxicos em quatro classes: (1) Altamente perigoso; (2) Muito perigoso; (3) Perigoso; e (4) Pouco perigoso (IBAMA, 2022). O Quadro 1 apresenta as classificações dos agrotóxicos utilizados neste estudo, conforme os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do IBAMA. Todos os agrotóxicos analisados são aprovados para uso nos Estados Unidos (EPA, 2024), enquanto na União Europeia, apenas o quincloraque e o imazapique não possuem aprovação (European Commission, 2024).

O conhecimento sobre os impactos negativos dos agrotóxicos em anfíbios é de grande urgência, particularmente em relação às espécies nativas. Muitos dos agrotóxicos utilizados na rizicultura carecem de uma compreensão completa sobre seus efeitos tóxicos em organismos aquáticos. Considerando ainda a influência de fatores abióticos, como a temperatura, nos efeitos deletérios de agrotóxicos nos anfíbios, e num contexto de mudanças climáticas globais, este estudo parte da hipótese de que aumentos nas flutuações diárias de temperatura potencializam a toxicidade da mistura de agrotóxicos, causando efeitos adversos mais proeminentes em girinos da espécie *Boana faber*.

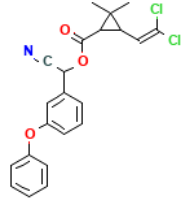
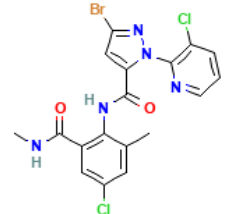
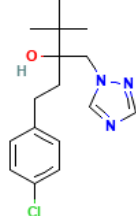
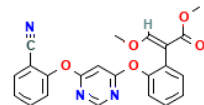
Com base nessa hipótese, testamos a predição de que as concentrações encontradas em ambientes aquáticos naturais dos agrotóxicos mencionados no Quadro 1 representam riscos para as populações nativas de anfíbios, comprometendo sua saúde, o que seria evidenciado por alterações em biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. Além disso, esses riscos deveriam ser exacerbados pela elevação da temperatura da água, que pode intensificar os efeitos tóxicos dos xenobióticos, aumentando a vulnerabilidade dos anfíbios.

Quadro 1 - Informações sobre os agrotóxicos utilizados neste estudo. As classificações toxicológicas da ANVISA e do IBAMA são baseadas nas formulações comerciais dos agrotóxicos.

(continua)

Classe	Princípio ativo	Solubilidade em água (mg·L ⁻¹)	pK _a	Log Kow	Classificação toxicológica (ANVISA)	Classificação ambiental (IBAMA)	Mecanismo de ação (organismo alvo)	Estrutura química
Herbicida	Bentazona	500	3,3	2,3	Categoria 4	Classe III	Inibidor do fotossistema II	
	Quincloraque	0,065	4,3	- 0,8	Categoria 5	Classe III	Regulador de crescimento	
	Penoxsulam	408	5,1	- 0,4	Categoria 5	Classe III	Inibidor de acetolactato sintase	
	Imazapique	220	3,6	0,4	Categoria 5	Classe III	Inibidor de acetolactato sintase	
	Fenoxaprop-P-etílico	-	-	-	Categoria 5	Classe II	Inibidor de acetil-CoA carboxilase	

(conclusão)

Classe	Princípio ativo	Solubilidade em água (mg·L ⁻¹)	pK _a	Log Kow	Classificação toxicológica (ANVISA)	Classificação ambiental (IBAMA)	Mecanismo de ação (organismo alvo)	Estrutura química
Inseticida	Cipermetrina	0,004	-	6,60	Categoria 4	Classe I	Modulador dos canais de sódio	
	Cloranttraniliprole	0,9 – 1,0	10,9	2,8	Categoria 4	Classe I	Modulador dos receptores de rianodina	
Fungicida	Tebuconazol	36	-	3,7	Categoria 4	Classe II	Inibidor de lanosterol 14-α-desmetilase	
	Azoxistrobina	6	-	2,5	Categoria 4	Classe II	Inibidor do complexo III da cadeia respiratória	

Fonte: AGROLINK (2024); BASF (2024); NIH (2024); SYNGENTA (2024); AGROFIT (2023); ANVISA (2019); Marchi *et al.* (2008).

1.3 *Boana faber* COMO MODELO DE ESTUDOS EM ECOTOXICOLOGIA

A *Boana faber* (Wied-Neuwied, 1821) é uma espécie de anfíbio pertencente à ordem Anura, família Hylidae e subfamília Hylinae, conhecida popularmente como sapo-martelo (Figura 2A, B). Apesar do nome popular, trata-se de uma perereca de grande porte com ocorrência no Brasil, Argentina e Paraguai (Figura 1), habitando bordas e fragmentos de florestas tropicais úmidas (Frost, 2025; IUCN, 2023).



Figura 1 - Mapa de ocorrência da espécie *Boana faber*. Fonte: AmphibiaWeb (2025).

A reprodução da *B. faber* ocorre predominantemente em estações chuvosas, entre dezembro e fevereiro. Os machos constroem ninhos em

ambientes de água parada, na margem de lagos e banhados, onde depositam as desovas (Figura 2C). Durante a noite, os machos vocalizam empoleirados na vegetação, emitindo sons semelhantes a batidas de martelo, característica que originou seu nome popular (Tavares-Junior *et al.*, 2020; Iop *et al.*, 2016). A espécie possui um estágio larval prolongado, de 8 a 12 meses, o que aumenta o seu tempo de exposição à estressores, reforçando-a como bioindicadora (Santos, 2022).

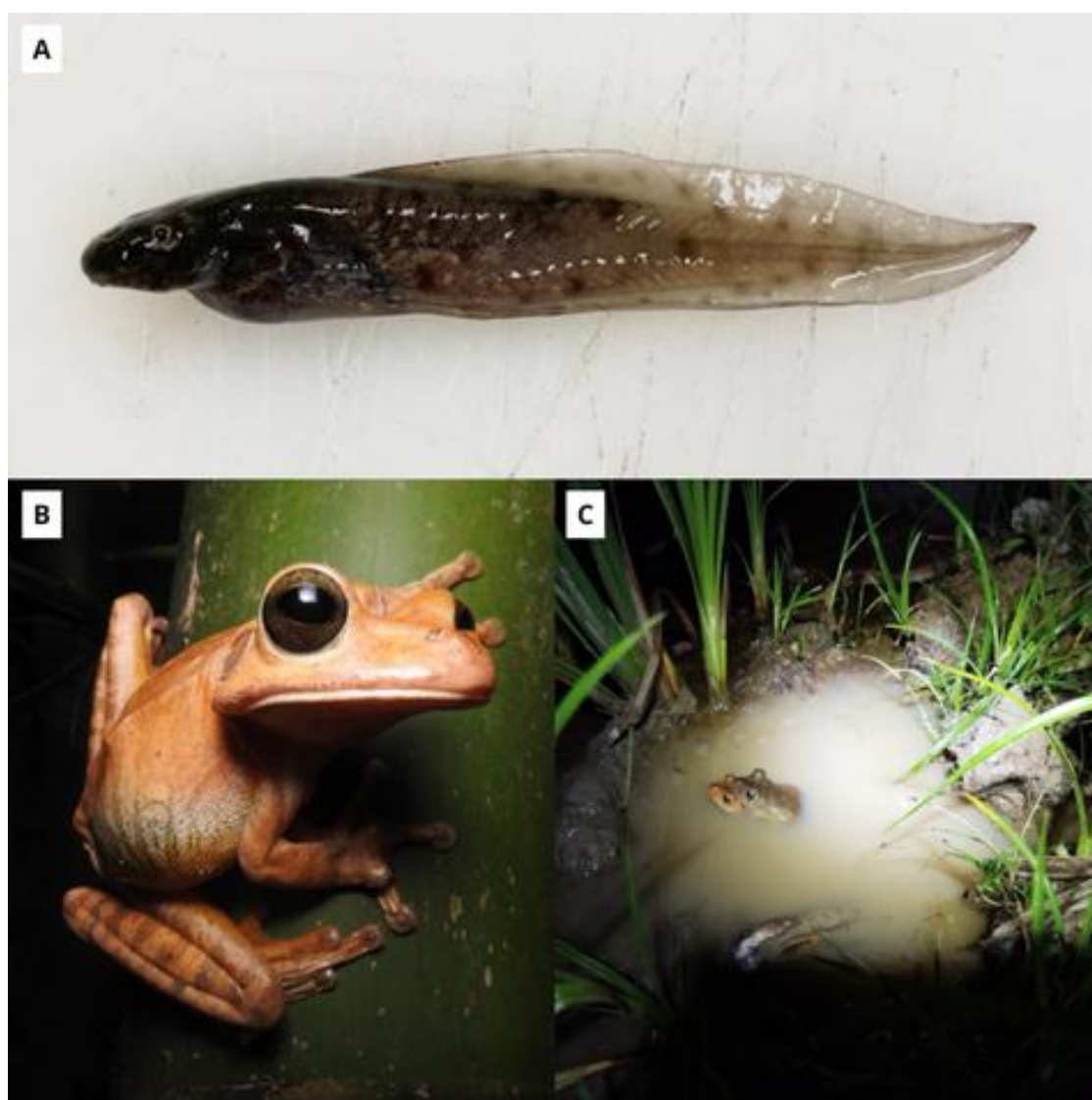


Figura 2 - (A) Girino no estágio Gosner 28; (B) adulto; e (C) ninho de *Boana faber*. Fonte: (A) Autora; (B) Victor Fávoro Augusto; (C) Zeinner de Paula (2024).

Apesar de seu estado de conservação ser classificado como "menos preocupante" pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN,

2023), *B. faber* enfrenta pressões antrópicas significativas. Sua presença em plantações e regiões próximas de áreas rurais, inclusive em regiões de rizicultura, a torna vulnerável à contaminação por agrotóxicos (Bitschinski *et al.*, 2024; IUCN, 2023). Não obstante, seu baixo risco de ameaça torna a espécie atrativa como modelo representativo da biodiversidade brasileira de anfíbios para estudos ecotoxicológicos.

Sua ampla distribuição e ocorrência em áreas abertas facilitam a coleta dos indivíduos. Os girinos (Figura 2A) são relativamente grandes, possibilitando a obtenção de material biológico suficiente para análises bioquímicas, histológicas e sanguíneas. Seu estado de conservação permite a coleta de indivíduos em ambiente natural, além disso, em estudos anteriores do grupo a *B. faber* se adaptou bem às condições laboratoriais (Bitschinski *et al.*, 2024; Warsneski *et al.*, 2024).

1.4 INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

A análise de biomarcadores é uma das ferramentas mais utilizadas no biomonitoramento ambiental, fornecendo informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes. Segundo Walker *et al.* (2012), biomarcadores são respostas biológicas de um organismo exposto a um contaminante, expressas a nível bioquímico, fisiológico, histológico, morfológico ou comportamental. Os biomarcadores possibilitam a detecção precoce de alterações no ambiente, antes que ocorram efeitos adversos em níveis superiores de organização biológica (Newman, 2015), contribuindo para a implementação de possíveis ações de mitigação e remediação.

1.4.1 Parâmetros bioquímicos

Quando expostos a substâncias tóxicas, os organismos ativam respostas bioquímicas para se defender. Ao atravessar a membrana celular, os xenobióticos podem ser biotransformados por enzimas que os tornam mais hidrofílicos para facilitar sua eliminação pelos tecidos (Timbrell, 2008; Buhler; Williams, 1988). A fase I da biotransformação representa a primeira linha de defesa contra compostos tóxicos e consiste em enzimas que modificam quimicamente estes compostos por reações de hidroxilação, oxidação e redução (Bocedi *et al.*, 2019). Um exemplo é a carboxilesterase (CbE), que hidrolisa ligações ésteres presentes em alguns dos agrotóxicos utilizados, como os piretróides (fenoxaprope-*P*-etílico e cipermetrina) e estrobirulinas (azoxistrobina), convertendo-os em produtos mais polares, que podem ser eliminados diretamente ou submetidos a reações adicionais de conjugação (Figura 3) (Ross; Crow, 2007; Cashman *et al.*, 1996). Na fase II da biotransformação, os xenobióticos são conjugados a moléculas endógenas como a glutationa (GSH), por meio da ação de enzimas transferases, como a glutationa-S-transferase (GST), resultando em compostos ainda mais hidrofílicos e/ou sinalizados para excreção por mecanismos especializados de fase III (Bocedi *et al.*, 2019).

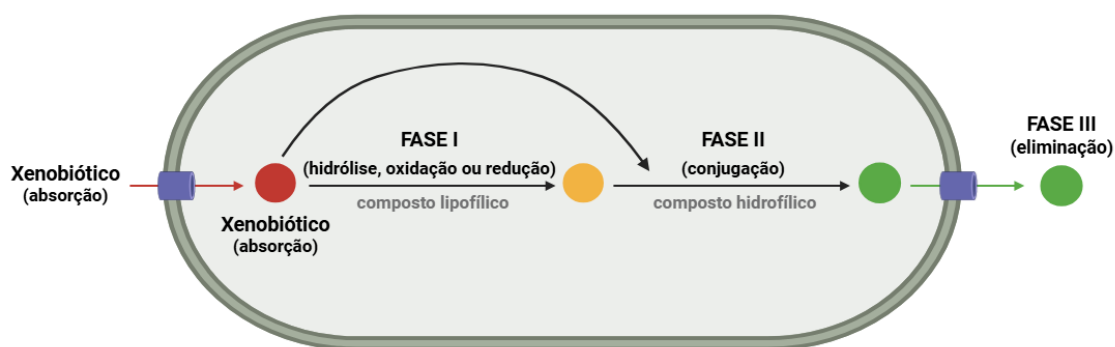


Figura 3 - Processos de biotransformação. Fonte: Adaptado de Bocedi *et al.* (2019).

A intoxicação por xenobióticos, assim como a exposição a altas temperaturas, intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs),

devido ao aumento do consumo de oxigênio nas reações de biotransformação, em resposta ao aumento do metabolismo energético celular, ativação de respostas inflamatórias ou devido a reações ciclo-redox (Figura 4). Em excesso, as EROs podem oxidar as macromoléculas, caso não sejam neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante, resultando em um estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, levando a danos oxidativos excessivos (Murphy *et al.*, 2022; Sies *et al.*, 2017). As EROs são formadas naturalmente durante a respiração celular em organismos aeróbicos e, em condições normais, são controladas pelo sistema antioxidante do organismo, que pode ser enzimático ou não enzimático (Burton; Jauniaux, 2011; Storz; Imlay, 1999).

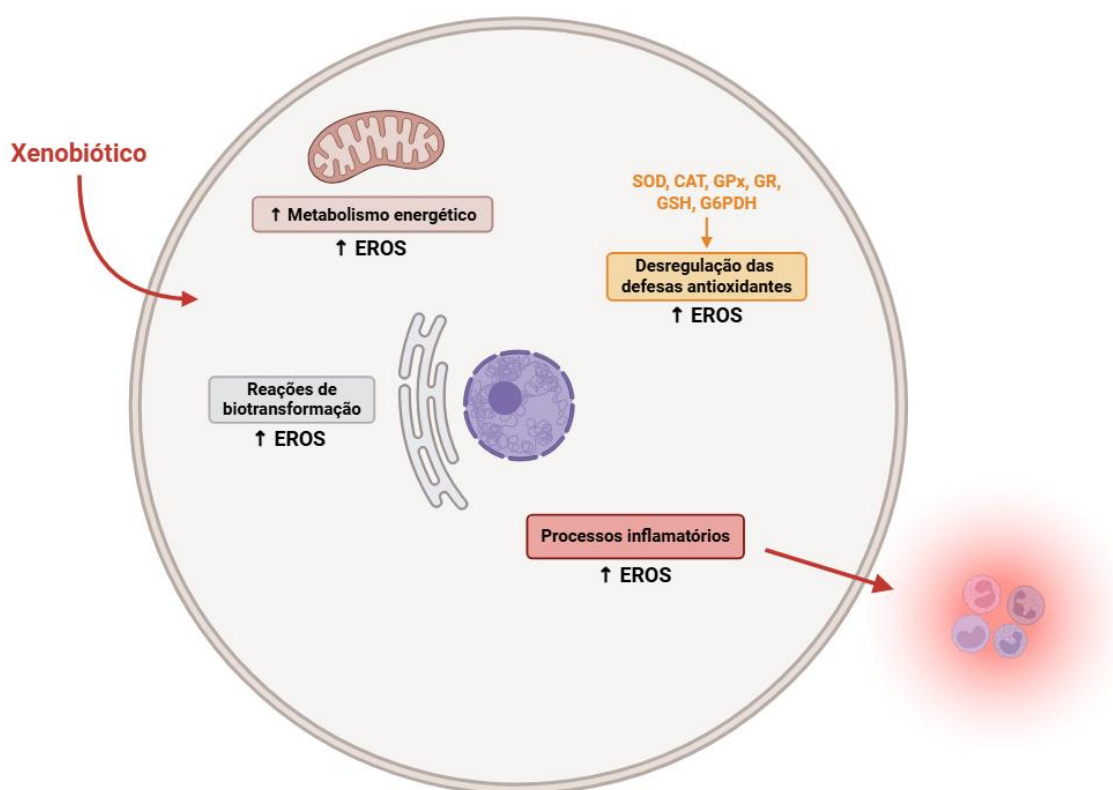


Figura 4 - Aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em intoxicações. Fonte: elaborado pela autora com BioRender (2024).

O sistema de defesa antioxidante dos organismos inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Figura 5). A SOD reduz o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2),

enquanto a CAT converte H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2). A GPx, por sua vez, também atua na detoxificação de peróxidos, neutralizando tanto o H_2O_2 quanto outros hidroperóxidos orgânicos. Já a glutathiona (GSH), um tripeptídeo que integra o sistema de defesa não enzimático, neutraliza espécies reativas ao ser oxidada a glutathiona dissulfeto (GSSG), além de atuar como cofator de enzimas antioxidantes (Lima, 2017). Os níveis intracelulares de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), necessários para fornecer elétrons às reações de biotransformação de xenobióticos e para a GR manter a glutathiona no seu estado reduzido, são mantidos pela atividade da G6PDH, que oxida glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato, concomitantemente à redução de NADP^+ em NADPH (Freitas, 2023).

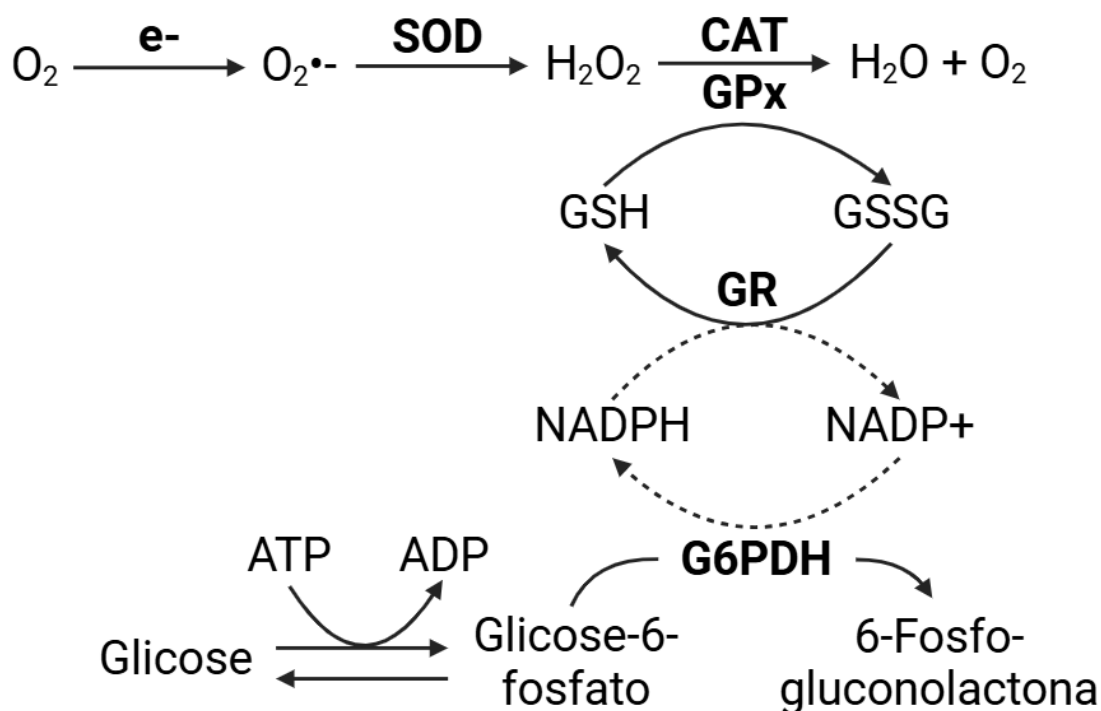


Figura 5 - Sistema de defesa antioxidante. Fonte: Adaptado de Freitas (2023).

Danos oxidativos podem ser causados quando o sistema de defesa antioxidante não consegue suprir a demanda de detoxificação e as EROs oxidam macromoléculas, como lipídios e proteínas (Yin *et al.*, 2011). No caso das proteínas, a oxidação da cadeia peptídica pode clivar ligações entre aminoácidos e formar compostos carbonílicos, comprometendo a sua estrutura e função

(Lushchak *et al.*, 2012). Dessa forma, a quantificação de proteínas carboniladas é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar danos causados por estresse oxidativo (Parvez; Raisuddin, 2005). Já a peroxidação lipídica ocorre em ácidos graxos poliinsaturados, cuja susceptibilidade à oxidação aumenta com o número de ligações duplas presentes (Pamplona *et al.*, 2019). Esse processo acontece em três etapas principais: iniciação, propagação e terminação. Uma única reação de iniciação resulta em 200-400 ciclos de propagação, produzindo aldeídos que podem ser altamente reativos e tóxicos, aumentando o dano oxidativo (Mas-bargues *et al.*, 2021; Pamplona *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2011). Entre esses aldeídos, o malondialdeído (MDA) é comumente utilizado como indicador de lesão por estresse oxidativo (Figura 6) (Mas-bargues *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2004).

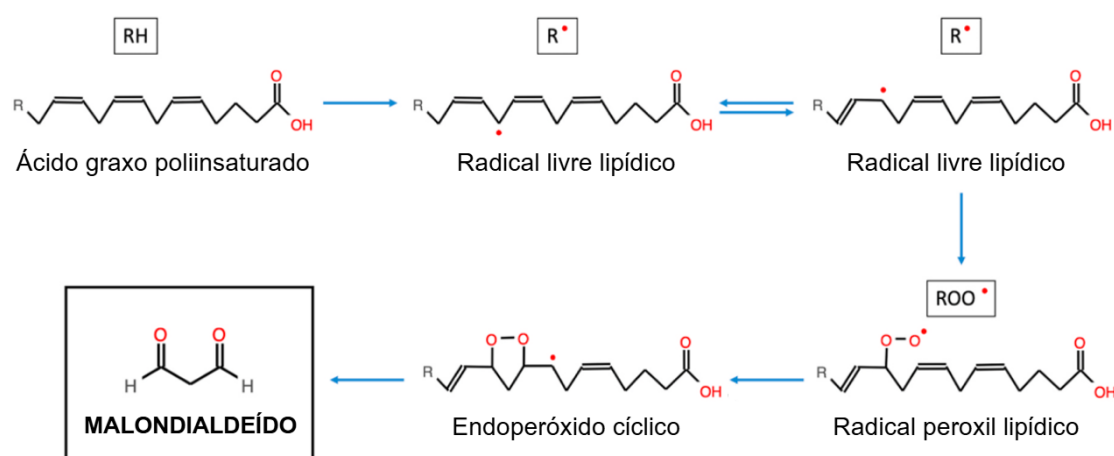


Figura 6 - Formação de malondialdeído (MDA) através da peroxidação lipídica. Fonte: Adaptado de Mas-bargues *et al.* (2021).

Estudos anteriores demonstraram que agrotóxicos do arroz como quincloraque, cipermetrina, tebuconazol e azoxistrobina podem alterar os níveis de MDA. Em *Lithobates catesbeianus* expostos ao quincloraque, por exemplo, observou-se redução na atividade da GST, da SOD e nos níveis de MDA (Silva, 2014). Em *Physalaemus gracilis* expostos à cipermetrina, houve aumento da atividade da GST e da SOD, acompanhado da redução da CAT (Rutkoski *et al.*, 2020). Já em girinos de *B. faber* expostos individualmente à azoxistrobina ou ao tebuconazol, foi registrado aumento na atividade da GST, da G6PDH e nos níveis

de proteínas carboniladas. Quando esses fungicidas foram aplicados em combinação, também se observou redução nos níveis de MDA (Warsneski *et al.*, 2024).

Um outro parâmetro bioquímico extensivamente usado como biomarcador em estudos de avaliação de efeitos de poluentes ambientais é a atividade da acetilcolinesterase (AChE). A AChE é uma enzima que encerra a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina (Figura 7) (Dvir *et al.*, 2010; Bainy *et al.*, 2006). Alguns xenobióticos, como metais e inseticidas das classes de organofosforados e carbamatos, inibem a AChE (Ndlovu; Basopo, 2022; Yologlu; Ozmen, 2015; Leite *et al.*, 2010). Com a inibição da enzima, há um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, afetando as respostas musculares e podendo gerar alterações comportamentais, problemas respiratórios, e até mesmo, causar a morte do organismo (Pundir; Chauhan, 2012). A alteração da atividade da AChE já foi extensivamente relatada em anfíbios, incluindo por compostos analisados neste trabalho, tais como tebuconazol, azoxistrobina e cipermetrina (Warsneski *et al.*, 2024; Rutkoski *et al.*, 2020).

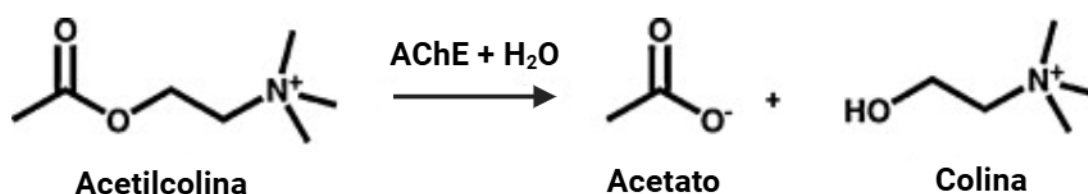


Figura 7 - Ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). Fonte: adaptado de Dvir *et al.* (2010).

1.4.2 Parâmetros histológicos

Alterações histopatológicas são indicadores de efeitos subletais, evidenciados por mudanças na composição e organização de determinados tecidos (Peltzer *et al.*, 2023). Em girinos expostos a estressores ambientais, como os agrotóxicos bentazona, clorantraniliprole e tebuconazol, utilizados neste estudo, já foram observadas lesões no fígado de *B. faber* (Warsneski *et al.*, 2024). Além disso, a exposição a outros agrotóxicos resultou em lesões

histológicas de diversos órgãos, como a glândula inter-renal, o coração e o intestino (Carneiro *et al.*, 2023; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2020).

O fígado está envolvido em diversos processos metabólicos, incluindo a biotransformação de compostos tóxicos, o que o torna um órgão-alvo para a avaliação dos efeitos subletais da exposição dos anfíbios a diferentes poluentes ambientais (Bach *et al.*, 2018). Dentre as alterações histológicas utilizadas como indicadores de danos hepáticos, destacam-se a presença de infiltrados inflamatórios, congestão vascular e a frequência e tamanho de melanomacrófagos, porém também é possível observar a presença de eosinófilos e a acidofilia dos hepatócitos (Bitschinski *et al.*, 2024; Warsneski *et al.*, 2024; Rutkoski *et al.*, 2022; Grott *et al.*, 2021; Bach *et al.*, 2018).

A glândula inter-renal exerce funções relacionadas a excreção de substâncias, podendo afetar a homeostase do girino caso o tecido renal sofra algum impacto com a exposição a poluentes (Monteiro *et al.*, 2018). Alguns critérios são utilizados para avaliar a severidade das lesões teciduais neste órgão, como a presença de infiltrados inflamatórios, congestão vascular, celularidade glomerular e atrofia glomerular (Carneiro *et al.*, 2023), podendo indicar efeitos dos compostos tóxicos.

1.4.3 Parâmetros genotóxicos

A metamorfose dos anfíbios é um processo que envolve uma série de divisões celulares, tornando o animal mais suscetível a alterações no material genético, que podem ser propagadas para a célula-filha e gerar malformações que afetam o indivíduo adulto (Silva *et al.*, 2023). O sangue dos anfíbios apresenta plasma, leucócitos, eritrócitos nucleados e trombócitos, que são células equivalentes às plaquetas dos mamíferos (Allender; Fry, 2008). Xenobióticos podem interagir com o DNA e ocasionar alterações na síntese de produtos da expressão gênica, comprometendo a homeostase fisiológica do organismo (Silva *et al.*, 2023).

A quebra das fitas do DNA durante o processo de divisão celular, decorrente dos efeitos clastogênicos dos poluentes, pode gerar fragmentos de material genético que eventualmente não são incorporados à célula-filha, resultando em partículas extranucleares de material genético adicionais, os chamados micronúcleos (Silva *et al.*, 2023). Desse modo, a avaliação da presença e da frequência de micronúcleos é um biomarcador de genotoxicidade muito utilizado em estudos de ecotoxicologia. Além disso, algumas outras anormalidades nucleares eritrocitárias representam outro parâmetro a ser avaliado em estudos com estressores ambientais, as quais resultam de eventos deletérios das intoxicações durante o processo de divisão celular.

Carrasco *et al.* (1990) descreveram diferentes anormalidades nucleares eritrocitárias, como núcleo bolhoso, lobado e entalhado, enquanto Fenech (2000) menciona sobre células binucleadas e anucleadas (Quadro 2).

Quadro 2 - Anormalidades observadas em eritrócitos.

Anormalidade	Descrição
Micronúcleo	Núcleo presente no citoplasma dos eritrócitos, desconectado do núcleo principal. Estrutura arredondada, com membrana própria, diâmetro de 1/5 a 1/20 do eritrócito e coloração consistente com a cromatina do núcleo principal.
Núcleo bolhoso	Pequena invaginação do envoltório nuclear.
Núcleo lobado	Apresenta invaginações, formando múltiplos lóbulos.
Núcleo entalhado	Apresenta uma fenda que aparenta ser demarcada pelo envoltório nuclear.
Célula binucleada	Apresenta dois núcleos.
Célula anucleada	Não apresenta núcleo.

Fonte: Fenech (2000); Carrasco *et al.* (1990).

Estudos anteriores demonstraram que a exposição a agrotóxicos como os utilizados neste trabalho, incluindo fenoxaprope-*P*-etílico, cipermetrina, clorantianiliprole, tebuconazol e azoxistrobina, pode resultar na formação de micronúcleos e anormalidades nucleares em anfíbios (Lopes *et al.*, 2025;

Barbhuiya *et al.*, 2024; Macagnan *et al.*, 2023; Benvindo-Souza *et al.*, 2020) e outros vertebrados, como *Danio rerio* e *Pethia conchonius* (Ray *et al.*, 2024; Castro *et al.*, 2018). Além disso, a temperatura pode exacerbar os eventos de formação de micronúcleos e anormalidades nucleares, como já observado em *Labeo rohita* e *Cyprinus carpio* mantidos a 35 °C ou 36 °C (Islam *et al.*, 2020; Shahjahan *et al.*, 2020; Ashaf-Ud-Doula *et al.*, 2019).

1.4.4 Parâmetros imunológicos

O sistema imune dos anfíbios sofre alterações ao longo do seu desenvolvimento, estabelecendo-se completamente apenas na fase adulta. Assim como em todos os vertebrados, o sistema imunológico dos anuros é composto pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa, responsáveis por induzir respostas locais e sistêmicas. A imunidade inata é formada por células fagocíticas capazes de eliminar patógenos por citotoxicidade, enquanto a imunidade adaptativa envolve linfócitos T e B, que expressam receptores de antígenos específicos em resposta a diferentes patógenos. Dessa forma, apenas os linfócitos fazem parte do sistema imune adaptativo (Rutkoski; Almeida, 2023; Robert; Ohta, 2009).

Esse sistema, no entanto, é sensível a alterações ambientais. As mudanças climáticas e o uso intensivo de agrotóxicos impactam negativamente a imunidade dos anfíbios. Flutuações térmicas acentuadas e a imprevisibilidade do regime de chuvas podem levar a períodos de seca prolongada, criando um ambiente estressante que aumenta a vulnerabilidade desses animais a doenças, como a quitridiomicose. Infecções desse tipo podem comprometer diretamente o sistema imunológico, assim como o próprio estresse fisiológico decorrente das consequências das mudanças climáticas, que incluem a redução dos níveis de oxigênio na água e períodos mais curtos para reprodução devido à menor disponibilidade hídrica. Esses fatores podem, em conjunto, interferir negativamente no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune (Rollins-Smith; Le Sage, 2023).

Com o aumento da temperatura, a toxicidade dos poluentes pode ser potencializada, ao mesmo tempo que enfraquece as respostas imunes (Hayes *et al.*, 2010). Patógenos também podem se tornar mais virulentos em ambientes poluídos e sob temperaturas elevadas, justamente quando os anfíbios estão mais vulneráveis, aumentando o risco de infecções e comprometendo a sua sobrevivência (Hayes *et al.*, 2010). Além disso, alguns xenobióticos, como inseticidas, herbicidas, fungicidas e antibióticos, são capazes de desencadear processos inflamatórios, ativando o recrutamento celular e alterando a produção de citocinas, que são moléculas sinalizadoras do sistema imunológico (Rutkowski; Almeida, 2023; Oliveira *et al.*, 2019).

Variações nas células de defesa podem indicar imunossupressão, sinal de que a imunidade dos animais foi comprometida. Portanto, alterações no perfil leucocitário (Quadro 3) podem ser utilizadas como biomarcadores de estressores ambientais, servindo como ferramenta para avaliar o estado do sistema imunológico (De Gregorio *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2020; Rymuszka; Adaszek, 2013).

Quadro 3 - Células sanguíneas observadas no sangue dos girinos e suas principais funções.

(continua)

Categoria	Célula	Descrição
Leucócito agranulócito	Linfócito	- Reconhecimento de antígenos - Síntese de anticorpos (células tipo B) - Citotóxicos (células tipo T)
	Monócito	- Apresentação de antígenos aos linfócitos - Fagocitose
Leucócito granulócito	Neutrófilo	- Resposta a inflamação, doenças e estresse - Fagocitose (principalmente de bactérias)
	Basófilo	- Resposta a reações de hipersensibilidade (liberação de grânulos de histamina que atraem eosinófilos e neutrófilos)
	Eosinófilo	- Resposta a reações de hipersensibilidade - Liberação de enzimas granulares para combate de parasitas

(conclusão)

Categoria	Célula	Descrição
Trombócito	Trombócito	- Coagulação sanguínea

Fonte: Rutkoski; Almeida (2023); Abbas *et al.* (2014); Robert; Ohta (2009).

1.5 EFEITOS DOS AGROTÓXICOS E DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO

A metamorfose dos anfíbios é um processo pós-embrionário desencadeado por hormônios da tireoide (TH), cujos níveis começam a ser detectados por volta do estágio 30 de Gosner (Anexo C). As fases da metamorfose são divididas em: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax metamórfico (Figura 8), processo que inclui o surgimento dos membros posteriores e anteriores, reabsorção da cauda, remodelação de órgãos, formação do folículo tireoidiano e adaptações metabólicas para a vida terrestre (Thambirajah *et al.*, 2019).

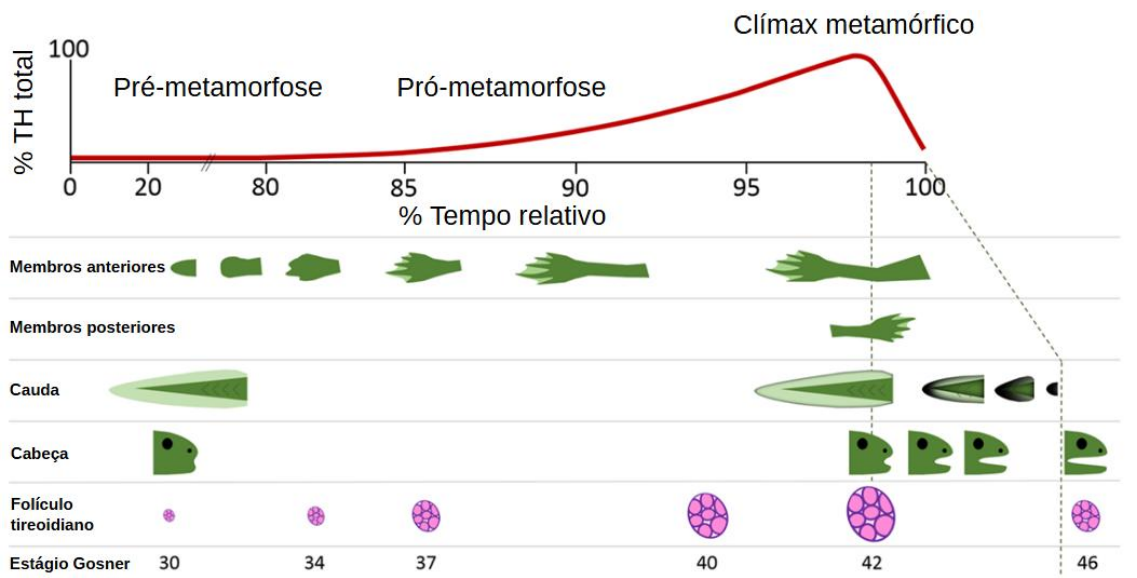


Figura 8 - Processos metamórficos em anfíbios. Fonte: adaptado de Thambirajah *et al.* (2019).

A exposição a químicos desreguladores endócrinos (EDCs), como os agrotóxicos, pode interferir nos níveis de triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), afetando o desenvolvimento e a taxa metabólica dos anfíbios. Esses compostos podem interferir na síntese, transporte, metabolismo e eliminação de hormônios, prejudicando o sistema homeostático (Mnif *et al.*, 2011; Sugiyama *et al.*, 2005; Cocco, 2002). Além disso, fatores abióticos como a temperatura também influenciam no processo de metamorfose: temperaturas elevadas tendem a aumentar os níveis de THs e acelerar o desenvolvimento, enquanto temperaturas mais baixas reduzem os níveis hormonais e desaceleram a metamorfose (Thambirajah *et al.*, 2019). Desse modo, girinos expostos simultaneamente ao calor e a EDCs podem apresentar uma metamorfose acelerada como resposta ao estresse ambiental, o que pode gerar indivíduos adultos com comprometimentos morfológicos e metabólicos (Orton; Tyler, 2015; Cauble; Wagner, 2005). No entanto, há estudos que apontam tanto para o retardo quanto para a ausência de alterações no desenvolvimento, indicando que os efeitos podem variar conforme a espécie e as condições ambientais.

Em uma meta-análise, foi constatado que temperaturas elevadas constantes reduzem o tempo de metamorfose, como observado em *Scaphiopus couchii* e *Spea multiplicata* (Alves-Ferreira *et al.*, 2024; Buchholz; Hayes, 2000). Entretanto, interações com poluentes podem mudar esse padrão. Em *Lithobates catesbeianus*, a exposição ao herbicida diuron ($200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) e ao seu metabólito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) a 34°C acelerou a metamorfose, enquanto a mesma exposição a 28°C não causou alterações, demonstrando o papel modulador da temperatura no processo de metamorfose (Freitas *et al.*, 2016). Resultado semelhante foi observado para o fungicida trifenilestanho ($1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), que acelerou o desenvolvimento de *L. sylvaticus* (Higley *et al.*, 2013).

Agrotóxicos em temperaturas mais amenas também podem causar alterações no processo metamórfico dos girinos. Em *L. catesbeianus* expostos ao herbicida tebutiuram ($10, 50$ e $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) a 25°C , houve redução no tempo de metamorfose em comparação ao controle, enquanto em 32°C as maiores concentrações (50 e $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) causaram um atraso nesse processo (Grott *et al.*, 2022a). No mesmo estudo, Grott *et al.* (2022a) observaram que os girinos mantidos a 32°C apresentaram um período de desenvolvimento mais longo do

que aqueles expostos a 25 °C, indicando que temperaturas mais elevadas desaceleraram o processo de metamorfose.

Efeitos semelhantes foram relatados em girinos de *Bufo bufo* expostos a glifosato, que apresentaram atrasos de 6 (2 mg a.e.·L⁻¹) a 14 dias (4 mg a.e.·L⁻¹) para completar a metamorfose (Mikó *et al.*, 2017), assim como em *L. sylvaticus* tratados com a fórmula comercial do herbicida (VisionMax® 2,9 mg a.e.·L⁻¹), os quais atrasaram 7 dias para atingir o clímax metamórfico (Navarro-Martín *et al.*, 2014). O inseticida endosulfan também retardou o desenvolvimento de *Rana dalmatina* nas concentrações de 0,01 e 0,05 mg·L⁻¹ (Lavorato *et al.*, 2013). Apesar dessas evidências, alguns estudos relatam que a exposição a estressores ambientais não resultou em alterações significativas no processo de metamorfose (Bitschinski *et al.*, 2024; Orton; Tyler, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de regimes de flutuação diária de temperatura em girinos nativos de sapo-martelo (*Boana faber*) expostos a uma mistura de agrotóxicos de rizicultura em concentrações ambientalmente realísticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se diferentes regimes de flutuação diária de temperatura, isoladamente ou em conjunto com uma mistura de agrotóxicos de rizicultura, afetam o desenvolvimento de girinos de *Boana faber*.
- Avaliar se a exposição aos agrotóxicos de rizicultura induz estresse oxidativo em girinos de *Boana faber*, e se esses efeitos negativos são intensificados com o aumento das oscilações térmicas em temperaturas elevadas.
- Avaliar se o fígado e a glândula inter-renal dos girinos apresentam alterações histopatológicas mais severas quando expostos a temperaturas elevadas com maiores flutuações, e se isso influencia na toxicidade dos agrotóxicos utilizados na rizicultura.
- Avaliar se regimes de maior oscilação térmica, com temperaturas mais altas, intensificam as respostas imunológicas e genotóxicas no sangue dos girinos de *Boana faber*.

3. HIPÓTESES

H0: As concentrações ambientalmente realísticas de uma mistura de agrotóxicos de rizicultura sob diferentes regimes de flutuação diária de temperatura não geram efeitos negativos em girinos de *Boana faber*.

H1: As concentrações ambientalmente realísticas de agrotóxicos utilizados no cultivo de arroz afetam a homeostase de girinos de *Boana faber*, causando estresse oxidativo e alterações histológicas, genotóxicas e imunológicas.

H2: Maiores flutuações diárias a temperaturas elevadas intensificam os efeitos negativos causados por uma mistura de agrotóxicos utilizados no cultivo de arroz nos girinos de *Boana faber*.

H3: Temperaturas elevadas com maiores oscilações diárias afetam o desenvolvimento e a morfologia dos girinos de *Boana faber*.

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA DOS GIRINOS EM CAMPO

A coleta dos girinos foi realizada em março de 2024 em áreas de brejo de um *camping* conhecido como “Cachoeira Formosa”, localizado na Estrada Geral Rio Herta, Alto Palmeiras, Rio dos Cedros, SC (26° 33' 23.9" S; 49° 22' 19.0" W), distante de áreas agrícolas e urbanizadas. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa realizaram a análise química da água dos brejos do local, certificando a ausência de agrotóxicos (Bitschinski *et al.*, 2024; Warsneski *et al.*, 2024).

Foram coletados aproximadamente 200 girinos com o auxílio de um puçá, por meio de varreduras em poças e brejos que podem servir como sítios reprodutivos para anfíbios anuros (Figura 9). Após capturados, os girinos foram transferidos para sacos plásticos com a água do ambiente para a triagem das espécies. As espécies não-alvo eventualmente capturadas foram soltas no local, enquanto os girinos de *Boana faber* foram mantidos em sacos de coleta de 50 L durante o transporte até o laboratório. A coleta de 200 girinos foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), com licença de nº 91718 (Anexo A).



Figura 9 - Local de coleta dos girinos. Fonte: Autora (2024).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após transportados ao laboratório, os girinos foram colocados em dois tanques de polietileno com 100 L de água cada (capacidade de 310 L), mantendo a densidade mínima de 1 girino·L⁻¹. Durante oito dias, os animais foram aclimatados em água reconstituída conforme NBR 15008 (ABNT, 2016), sob condições controladas de pH 7,0 ± 0,5, fotoperíodo natural, temperatura de 25 °C, aeração constante e alimentação diária com ração comercial para peixe (marca Poytara), contendo 30% de proteína.

Para realizar a exposição aos agrotóxicos, os girinos no estágio de desenvolvimento 28 (Gosner, 1960) (Figura 2A), foram transferidos para aquários com capacidade de 3 L. Cada aquário continha três indivíduos e 3 L de água reconstituída, mantendo a densidade de 1 girino·L⁻¹ (peso médio de 1,2 g). Durante todo o período experimental, os aquários foram mantidos sob aeração constante, pH 7.0 ± 0,5 e fotoperíodo natural. A alimentação ocorreu diariamente com 0,05 g por animal da mesma ração utilizada na aclimação.

Os regimes de oscilação térmica foram definidos em 25 - 28 °C e 25 - 34 °C, considerando a possibilidade de resfriamento da água ao longo do dia e

buscando simular condições próximas das encontradas em ambientes naturais, onde as flutuações térmicas diárias podem ser ainda maiores (Freitas; Almeida, 2016). Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: i) grupo controle com temperatura máxima de 28 °C (C28); ii) grupo controle com temperatura máxima de 34 °C (C34); iii) grupo exposto a mistura dos agrotóxicos nas suas menores concentrações com temperatura máxima de 28 °C (L28); iv) grupo exposto a mistura dos agrotóxicos nas suas menores concentrações com temperatura máxima de 34 °C (L34); v) grupo exposto a mistura dos agrotóxicos nas suas maiores concentrações com temperatura máxima de 28 °C (H28); e vi) grupo exposto a mistura dos agrotóxicos nas suas maiores concentrações com temperatura máxima de 34 °C (H34) (Figura 10).

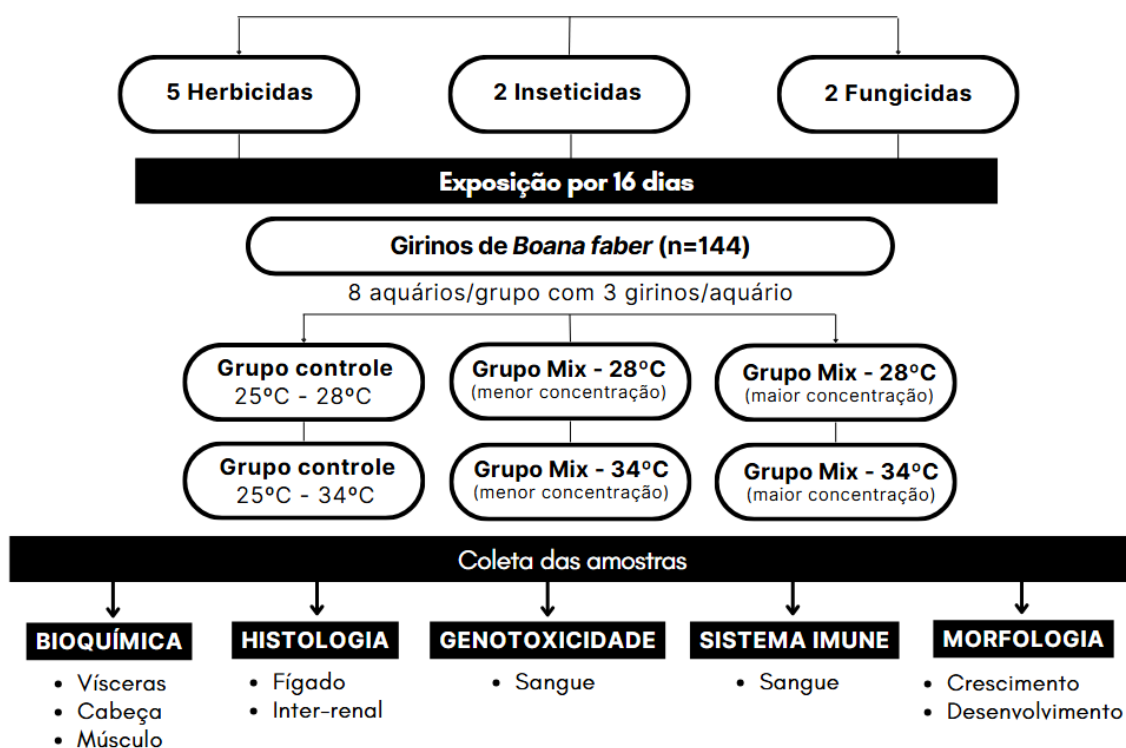


Figura 10 - Fluxograma do delineamento experimental. Fonte: Autora (2024).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, foram coletadas amostras de água adjacentes a áreas de rizicultura em canais de drenagem de cultivo de arroz e em três pontos do Rio Putanga no município de Massaranduba, SC (Figura 11), conforme detalhado por Bitschinski *et al.* (2024) e Warsneski *et al.* (2024).

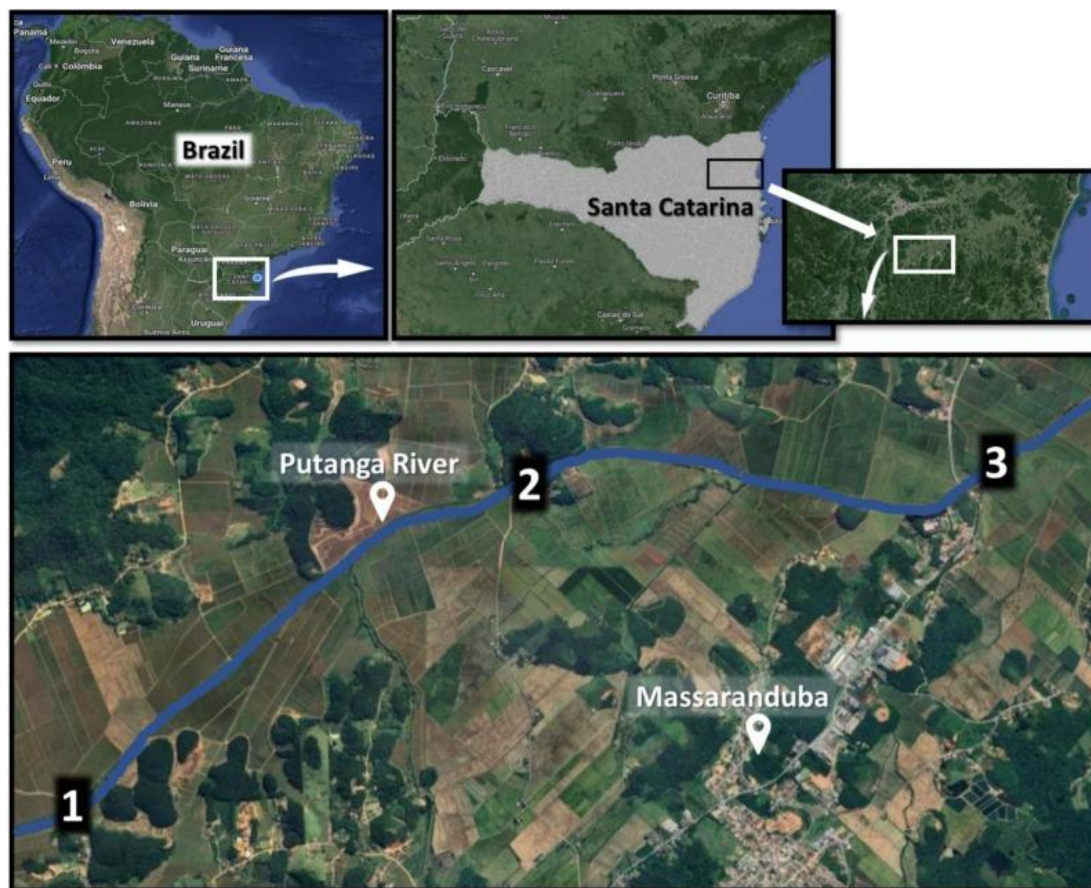


Figura 11 - Pontos de coleta de água. Fonte: Bitschinski *et al.* (2024).

Foram encontrados nove agrotóxicos nas concentrações indicadas na Tabela 1, que foram as utilizadas em nosso experimento. Por conta da insolubilidade em água, uma solução estoque de cada um dos agrotóxicos (padrões analíticos da Sigma-Aldrich) foi preparada em metanol na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para preparo da mistura dos agrotóxicos, cada solução estoque foi diluída para atingir a concentração desejada em um volume final de $100 \text{ } \mu\text{L}$. Os grupos controle receberam o mesmo volume de metanol para evitar ambiguidades na interpretação dos resultados devido a eventuais efeitos do solvente aos animais.

Tabela 1 - Agrotóxicos encontrados em áreas adjacentes à rizicultura.

Classe	Princípio ativo	Menor concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Maior concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Pureza
Herbicida	Bentazona	2,12	17,85	≤ 98
	Quincloraque	2,83	5,14	≤ 98
	Penoxsulam	2,64	6,53	≤ 98
	Imazapique	0,60	0,60	≤ 98
	Fenoxaprope- <i>P</i> -etílico	0,72	1,46	≤ 95
Inseticida	Cipermetrina	0,81	0,81	≤ 90
	Clorantraniliprole	0,72	3,76	≤ 95
Fungicida	Tebuconazol	1,23	2,64	≤ 98
	Azoxistrobina	0,70	1,62	≤ 98

Fonte: Bitschinski *et al.* (2024); Warsneski *et al.* (2024); dados não publicados.

Para gerar os ciclos de flutuação diária da temperatura nos tratamentos, termostatos autorreguláveis eram ligados às 10 horas da manhã, com temperatura inicial de 25 °C e ajustados para atingirem as temperaturas máximas de 28 °C ou 34 °C, de acordo com o grupo tratamento. Com isso, um grupo teve uma oscilação diária de temperatura de 3 °C ao longo do dia, enquanto outro teve uma oscilação de 9 °C. Para o resfriamento da água, os termostatos de cada tratamento eram desligados às 14 h, para retornar a temperatura da água a 25 °C novamente. Houve um teste piloto para definir o horário mais adequado para ligar e desligar os termostatos, com o objetivo de que o pico da oscilação de temperatura ocorresse por volta das 13 h, permitindo o resfriamento da água até o dia seguinte.

Com auxílio de um *data logger*, a temperatura foi aferida a cada hora e conferida manualmente com um termômetro de mercúrio às 10h, 13h, 16h e 19h (Figura 12). As variáveis hídricas de pH (TECNAL), temperatura, concentração de amônia (HANNA HI83399-02), oxigênio dissolvido (HANNA HI9146) e condutividade elétrica (TECNAL TEC-MP) foram monitoradas de acordo com Grott *et al.* (2021), durante a aclimação e o período experimental.



Figura 12 - *Data logger* medindo a temperatura dos grupos experimentais. Fonte: Autora (2024).

O experimento foi conduzido em 48 aquários, divididos em seis grupos experimentais, com oito réplicas por grupo ($n=8$) e três girinos por aquário (densidade de $1 \text{ girino} \cdot \text{L}^{-1}$), resultando em um total de 144 indivíduos. O número de girinos por grupo ($n=8$) foi determinado com base no cálculo de poder amostral no software R (versão 1.3.1056). Dois girinos foram utilizados para análises bioquímicas, sendo que o sangue de um deles foi submetido às análises genotóxicas e imunológicas, enquanto o terceiro girino foi destinado às análises histológicas do fígado e da glândula inter-renal.

Todos os animais, incluindo àqueles do grupo controle e dos grupos tratamento, permaneceram sob as condições experimentais por 16 dias. Os grupos controle não receberam a adição de agrotóxicos, apenas de metanol conforme já descrito. A cada dois dias às 8h da manhã, a água dos aquários foi inteiramente trocada, antes do início do aquecimento dos tanques, usando água recondicionada a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os agrotóxicos ou o metanol foram adicionados novamente nos aquários, garantindo a contínua presença dos agrotóxicos e evitando o acúmulo de alimento e excretas (fezes e amônia).

Dados morfométricos dos animais como comprimento total, comprimento da cauda e peso foram verificados no primeiro e último dia de experimento, assim como o estágio de desenvolvimento (Gosner, 1960), que foi verificado com o auxílio de um estereomicroscópio (ZEISS Stemi DV4). No 16º dia após o início da exposição, todos os animais foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e sacrificados por concussão na cabeça, de acordo com as recomendações das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Resolução Normativa nº 13/2013. Após isso, as amostras biológicas foram coletadas para a realização de análises bioquímicas, histológicas e sanguíneas, sendo acondicionadas, respectivamente, em nitrogênio líquido, formol 10% e em temperatura ambiente.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Regional de Blumenau, Protocolo nº 008-23 (Anexo B)

4.3 ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA

Ao final do experimento, foi realizada uma simulação em aquários sem animais para verificar as concentrações dos agrotóxicos adicionados. Foram preparados 1 L de água com as menores concentrações e 1 L com as maiores concentrações, cada um em duplicata. As amostras foram filtradas e enviadas ao Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As amostras foram analisadas para determinação de resíduos de agrotóxicos por meio de extração em fase sólida (SPE), seguida de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Devido ao tamanho diminuto dos órgãos dos girinos, insuficientes para analisá-los individualmente, optamos por coletar as vísceras totais dos animais (~200 mg) após cortar a cavidade abdominal com tesoura cirúrgica, as quais foram posteriormente homogeneizadas (MARCONI MA102) na proporção 1:4 (massa:volume) com tampão em pH 7,4, contendo: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, cloreto de potássio (KCl) 150 mM, DL-ditiotreitol (DTT) 1 mM, hidroxitolueno butilado (BHT) 2,3 mM e fluoreto de fenil metano sulfonil (PMSF) 0,1 mM (Grott *et al.*, 2021). A cabeça e o músculo da cauda foram também coletados e homogeneizados no mesmo tampão, na proporção 1:5 (massa:volume) e sem BHT e PMSF, para as análises das esterases, visto que o PMSF pode interferir na análise destas enzimas. O material foi centrifugado a 10.000 *g* (HERMLE Z 326 K) por 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi separado em alíquotas. Estas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até a realização das análises bioquímicas (Quadro 4). Todas as análises enzimáticas foram realizadas nas temperaturas médias dos dois grupos de tratamento, sendo: 25 °C para os grupos com pico de temperatura de 28 °C; e 28 °C para grupos com pico de temperatura de 34 °C.

Quadro 4 - Métodos utilizados para as análises bioquímicas.

(continua)

Biomarcador	Sigla	Método	Unidade
Proteínas totais	-	Bradford (1976)	mg·mL ⁻¹ tecido
Carboxilesterase	CbE	Ellman <i>et al.</i> (1961)	mU·mg ⁻¹ proteína
Glutathiona S-transferase	GST	Keen <i>et al.</i> (1976)	mU·mg ⁻¹ proteína
Superóxido dismutase	SOD	McCord; Fridovich (1969)	U·mg ⁻¹ proteína
Catalase	CAT	Aebi (1984)	U·mg ⁻¹ proteína
Glutathiona peroxidase	GPx	Wendel (1981)	U·mg ⁻¹ proteína
Tióis livres totais	-	Beutler <i>et al.</i> (1963)	μg·mg ⁻¹ proteína
Glutathiona redutase	GR	Carlberg; Mannervik (1985)	mU·mg ⁻¹ proteína

(conclusão)

Biomarcador	Sigla	Método	Unidade
Glicose-6-fosfato desidrogenase	G6PDH	Glock; McLean (1953)	mU·mg ⁻¹ proteína
Malondialdeído	MDA	Almeida <i>et al.</i> (2004)	nmol·g ⁻¹ tecido
Proteínas carboniladas	PC	Levine <i>et al.</i> (1990)	nmol·mg ⁻¹ proteína
Acetilcolinesterase	AChE	Ellman <i>et al.</i> (1961)	mU·mg ⁻¹ proteína

Fonte: Autora (2024).

As proteínas totais foram determinadas seguindo o método de Bradford (1976). Para a curva de proteínas foi preparado uma solução com 5 µL de padrão de proteínas (Sigma-Aldrich P5369) diluídos em 995 µL do tampão de homogeneização. Após isso, 100 µL desta solução foi diluído em 900 µL do mesmo tampão. Em uma microplaca, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µL desta última solução foram pipetados em duplicata para a curva de calibração. Posteriormente, foi adicionado 10 µL de amostra diluída 10 vezes e o volume de Bradford correspondente para totalizar 200 µL, além disso, o branco foi feito apenas com Bradford. A microplaca foi incubada durante cinco minutos e lida em um leitor de microplacas (FLUOstar Omega BMG LABTECH) com absorbância a 595 nm. O resultado foi expresso em mg·mL⁻¹.

A atividade da carboxilesterase foi medida seguindo um protocolo adaptado de Ellman *et al.* (1961) que utiliza feniltioacetato (PhE) como substrato. Na reação, o composto 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) interage com grupos tióis livres, resultando na formação de um produto de coloração amarelada. Para uma concentração de 5 mM (cabeça), foi adicionado em uma microplaca 10 µL de amostra pura, 231,67 µL de DTNB 1 mM e 8,33 µL de PhE. A leitura da microplaca foi realizada a 415 nm com quatro ciclos de 59 segundos e o resultado foi expresso em mU·mg⁻¹ de proteína.

A glutathione S-transferase teve atividade determinada conforme adaptação do método descrito por Keen *et al.* (1976), no qual houve o monitoramento da velocidade da reação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione em sua forma reduzida (GSH) em absorbância a 340 nm. Os meios de reação (GSH e CDNB) foram preparados em tampão fosfato de

potássio 100 mM (pH 7,0). Em uma microplaca, foi adicionado 5 μ L das amostras diluídas 10 vezes e 50 μ L de GSH 2,22 mM. A microplaca foi incubada nas temperaturas médias do experimento durante 1 minuto e 30 segundos, e por fim, foi acrescentado 50 μ L de CDNB 2,22 mM para realizar a leitura. O resultado foi expresso em $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A determinação da superóxido dismutase foi de acordo com método adaptado de McCord; Fridovich (1969), que avalia a taxa de inibição da redução do citocromo c. O meio de reação foi preparado com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 1 mM (pH 7,0), xantina 500 μ M e citocromo c. Em uma microplaca, foi pipetado em média 2 μ L de amostra pura, 3 μ L de xantina oxidase 0,2 U e adicionado 200 μ L do meio de reação. A leitura foi realizada com absorbância a 550 nm e a taxa de inibição foi calculada para cada amostra. O resultado foi expresso em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade enzimática da catalase foi avaliada através da velocidade de decomposição de H_2O_2 , conforme protocolo adaptado de Aebi (1984). Foi utilizado tampão TRIS (1 M, pH 8,0) com EDTA 5 mM e H_2O_2 30 mM como substrato. As amostras e o meio de reação (4 μ L : 996 μ L) foram adicionados em uma cubeta de quartzo com volume total de 1 mL. Subsequentemente, o decréscimo de H_2O_2 foi avaliado durante 1 minuto por método espectrofotométrico (UV/VIS Spectrophotometer - SHIMADZU 1650 PC) com absorbância a 240 nm. O resultado foi expresso em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A glutathiona peroxidase foi analisada de acordo com protocolo adaptado de Wendel (1981), que consiste na redução da glutathiona oxidada pela glutathiona redutase na presença de NADPH. O meio de reação foi preparado com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 5 mM (pH 7,0), GSH, NADPH e GR 0,2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Foram adicionados, em uma microplaca, 180 μ L do meio, 10 μ L de amostra pura e 10 μ L de hidroperóxido de terbutila. Posteriormente, o consumo de NADPH foi quantificado em quatro ciclos de 30 segundos em um leitor de microplacas com absorbância a 340 nm, em que o resultado foi expresso em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Os níveis de tióis livres totais, incluindo a GSH, foram medidos segundo protocolo de Beutler *et al.* (1963), no qual os grupos tiol reagem com o DTNB formando tiolato de cor amarelada. Foi preparado uma curva padrão com as

concentrações de 5, 10, 30, 60, 90, 150, 200 e 400 μM . A análise foi realizada no dia da homogeneização das vísceras, em que 50 μL do sobrenadante foi adicionado em um microtubo contendo 50 μL de água ultrapura. Esse processo também foi feito com cada ponto da curva padrão. Em uma microplaca foi pipetado 25 μL de amostra diluída, 175 μL de tampão TRIS 50 mM (pH 7,4) e 50 μL de DTNB 2,5 mM. Posteriormente, foi pipetado 50 μL dessa reação e 150 μL de tampão TRIS 50 mM (pH 7,4) em outro poço da microplaca. O tiolato foi quantificado com absorbância a 412 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da glutathiona redutase foi quantificada por protocolo adaptado de Carlberg; Mannervik (1985), que avalia a redução da glutathiona dissulfeto (GSSG) em glutathiona, através da oxidação do NADPH pela GR. O meio de reação foi preparado com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 5 mM (pH 7,0), GSSG 2 mM e GSH 0,15 mM. Para cada amostra, foi adicionado um meio branco sem GSSG e GSH e o meio de reação em duplicata, a quantidade de amostra foi de 10 μL e dos meios de 70 μL . Após isso, a microplaca foi incubada durante 5 minutos na temperatura média dos experimentos (25 °C ou 28 °C), e em seguida, adicionou-se 20 μL de NADPH 0,1 mM. O consumo de NADPH foi quantificado em seis ciclos de 25 segundos em um leitor de microplacas com absorbância a 340 nm. O resultado foi expresso em $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A determinação da atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase foi realizada segundo método adaptado de Glock; McLean (1953), em que a formação de NADPH é medida a 340 nm durante 1 minuto. O método utiliza glicose-6-fosfato (G6P) como substrato para a G6PDH reduzir nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP^+) em NADPH. O meio de reação foi preparado com tampão TRIS 0,1 M (pH 7,0), cloreto de magnésio (MgCl_2) 0,2 M, G6P e NADP^+ . Para cada amostra foi realizado a leitura de um branco contendo 5 μL de amostra e 200 μL do meio sem G6P, além das leituras em duplicata com o meio de reação. O resultado foi expresso em $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica, foi quantificado o produto formado pela reação de malondialdeído e ácido tiobarbitúrico (TBA). Conforme

protocolo adaptado de Almeida *et al.* (2004), 100 μL das vísceras homogeneizadas foram adicionadas em 300 μL de TBA 27,7 mM diluído em ácido clorídrico (HCl) 200 mM e aquecidas em banho seco (VULCAN BS-150-S-BI) a 90 °C durante 40 min. Posteriormente, foi adicionado 500 μL de álcool butílico (n-butanol) e as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 5.000 g por 5 min a 4 °C. Foi coletado 200 μL do sobrenadante para leitura com absorbância a 550 nm, tendo resultado expresso em $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido. A curva de calibração (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 5; 10 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi preparada em 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) seguindo o mesmo protocolo das amostras, com um branco com 200 μL de n-butanol.

Os níveis de proteínas carboniladas foram medidos de acordo com método adaptado de Levine *et al.* (1990), em que os grupos carbonila reagem com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenil-hidrazona. As amostras de vísceras (entre 80 e 100 μL) foram adicionadas em microtubos contendo ~250 μL de DNPH 0,01 M preparado em HCl 2 M, e mantidas em banho seco a 35 °C durante 1 hora com agitação no vórtex (KASVI K45-2820) a cada 15 min. Para a lavagem do *pellet*, ~350 μL de ácido tricloroacético (TCA) 1,7 M foi adicionado nas amostras, e estas ficaram acondicionadas em gelo durante 10 min, para em seguida serem agitadas no vórtex e centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 200 μL de acetato de etila:etanol (1:1) foi adicionado aos microtubos, os quais foram agitados no vórtex e centrifugados a 9.000 g durante 3 min a 4 °C. Esta etapa foi repetida três vezes, e após a última lavagem, os microtubos ficaram durante 30 min em temperatura ambiente para a secagem do *pellet*. Por fim, ~500 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,2 M foi adicionado e agitado no vórtex até o *pellet* desmanchar, e posteriormente, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 10.000 g durante 10 min a 15 °C. A leitura foi feita com 200 μL de amostra no leitor de microplacas com absorbância a 370 nm, tendo resultado expresso em $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A enzima acetilcolinesterase foi avaliada segundo protocolo adaptado de Ellman *et al.* (1961), a partir da hidrólise da acetiltiocolina em tiocolina, que faz com que os grupos tióis reajam com o DTNB e produzam uma cor amarelada. Em uma microplaca, foi adicionado 10 μL de amostra pura, 200 μL de DTNB 1

mM para cabeça e músculo ou 225 μL para as vísceras e 50 μL de iodeto de acetiltiocolina (AcChI) 54 mM para cabeça e músculo ou 25 μL para as vísceras. A taxa de produção de tiocolina foi medida em um leitor de microplacas a 415 nm em quatro ciclos de 59 segundos. O resultado foi expresso em $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

No final do experimento, cinco girinos escolhidos aleatoriamente de cada grupo foram armazenados em um frasco contendo formaldeído 10%. Após uma semana, os animais foram transferidos para etanol 70% até o momento de processamento das amostras. O fígado e a glândula inter-renal foram dissecados dos animais após os girinos estarem fixados.

As amostras passaram por uma série de desidratação em etanol e em xilol (etanol 80% 15min, etanol 90% 15min, etanol 95% 15min, etanol 100% I 15min, etanol 100% II 20min, etanol:xilol (1:1) 10min, xilol I 10min, xilol II 10min, parafina I 15min, parafina II 15min, parafina III 20min), para impregnação em parafina. Após inseridos em blocos de parafina, foram cortados em micrótomo (MICROM) e corados com eosina e hematoxilina (Rutkoski *et al.*, 2022).

As análises foram realizadas às cegas em um microscópio com aumento de 400x. Conforme adaptado de Bernet *et al.* (1999), definiu-se quatro níveis no escore de severidade, sendo: (0) ocorrência inexistente (sem alterações); (1) ocorrência mínima (poucas alterações); (2) ocorrência moderada (alterações facilmente observadas); e (3) ocorrência severa (muitas alterações). Os critérios de severidade definidos para o tecido hepático foram a presença de infiltrados inflamatórios, eosinófilos, congestão vascular, frequência e tamanho de melanomacrófagos e a acidofilia de hepatócitos. Enquanto para o tecido renal, os critérios foram a presença de congestão vascular, infiltrados inflamatórios, celularidade glomerular e atrofia glomerular. Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão dos escores de severidade.

4.6 ANÁLISES GENOTÓXICAS E IMUNOLÓGICAS

O sangue foi coletado por punção cardíaca no último dia de experimento e depositado 10 µL em uma lâmina de vidro, onde foi realizado o esfregaço sanguíneo em duplicata. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente durante 24 horas para secarem completamente, e em seguida, foram coradas com kit panóptico rápido (LABORCLIN). Para analisar o diferencial de leucócitos (leucograma) e os marcadores genotóxicos, foi utilizado microscópio óptico (LEICA DM500) com aumento de 1000x.

Em cada lâmina foi contabilizado 1000 eritrócitos para avaliar a frequência de micronúcleos (MN) e as anormalidades nucleares eritrocitárias (ENAs), como núcleo bolhoso, lobado, entalhado e células binucleadas ou anucleadas, seguindo os critérios de Lajmanovich *et al.* (2014), Fenech (2000) e Carrasco *et al.* (1990) (Figura 13). Além disso, em cada lâmina foi contabilizado 100 leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e eventuais trombócitos, conforme Gregorio *et al.* (2021) e Oliveira *et al.* (2019) (Figura 14).

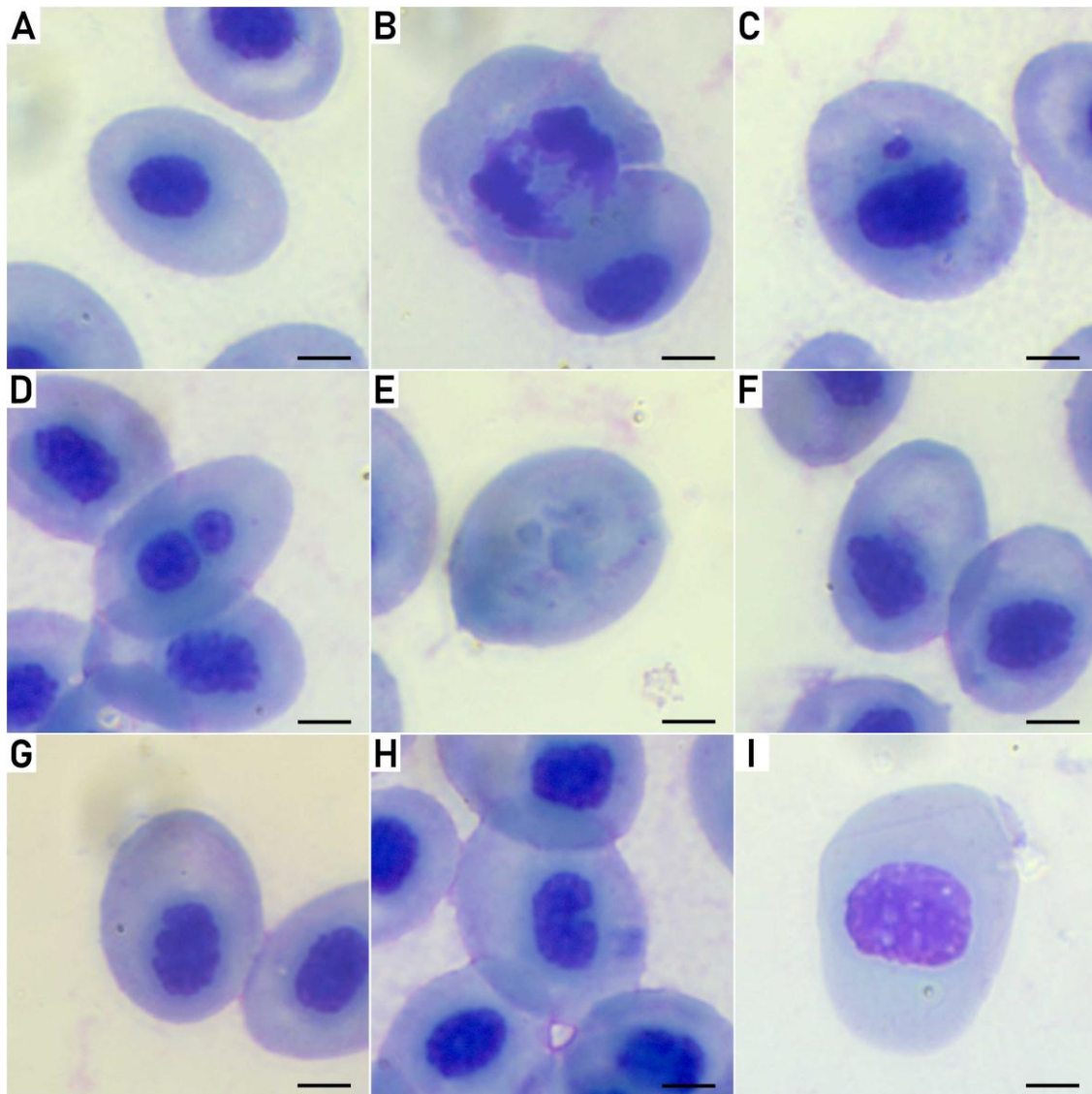


Figura 13 - Caracterização das anormalidades nucleares de eritrócitos observados em girinos de *Boana faber*. Eritrócito normal (A); núcleo mitótico (B); micronúcleo (C); célula binucleada (D); célula anucleada (E); núcleo bolhoso (F); núcleo lobado (G); núcleo entalhado (H); e eritrócito imaturo (I). Fonte: Autora (2024).

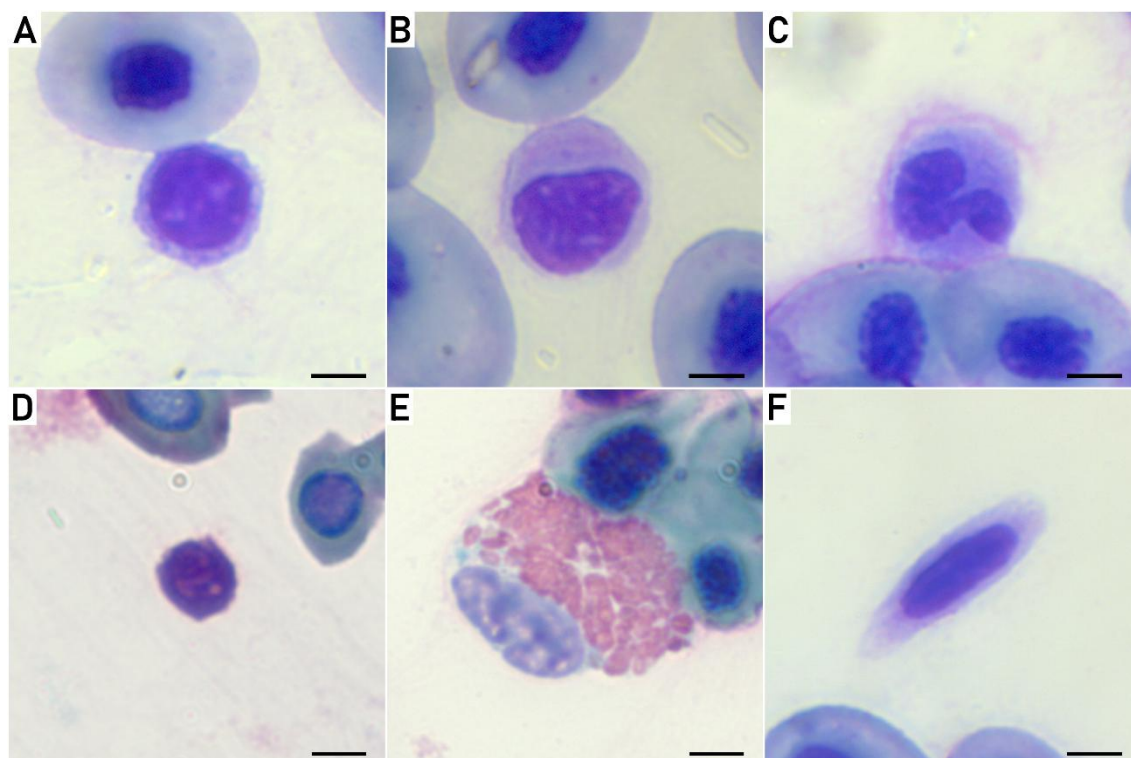


Figura 14 - Leucócitos presentes no sangue dos girinos de *Boana faber*: linfócito (A), monócito (B), neutrófilo (C), basófilo (D) e eosinófilo (E). Trombócito indicado em (F). Fonte: Autora (2024).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade pelo teste de Levene. Quando necessário, aplicou-se uma transformação logarítmica para normalizar os dados. O efeito da oscilação de temperatura, da mistura de agrotóxicos e da interação entre essas variáveis foi analisado por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias. Para dados não paramétricos, utilizou-se ANOVA robusta de duas vias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foram investigadas com o teste *post hoc* Bonferroni para dados paramétricos e não paramétricos. Os outliers foram removidos com base no intervalo interquartil, identificado a partir de boxplots. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares R (versão 4.4.1) e GraphPad Prism® 8.

5. RESULTADOS

5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Não houve mortalidade em nenhum dos grupos experimentais. Considerando que os experimentos geraram uma quantidade muito grande de resultados e comparações, especialmente considerando que duas variáveis foram estudadas (concentração dos agrotóxicos e temperatura), optou-se neste trabalho por apresentar apenas os gráficos de resultados com diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Os dados dos demais resultados que não apresentaram alterações significantes entre os grupos serão mostrados agrupados na seção de apêndices ao final deste documento. Ainda, de modo a melhor organizar a apresentação dos resultados, estes serão exibidos na seguinte ordem para cada parâmetro de análise: (1) efeitos da temperatura; (2) efeitos da mistura dos agrotóxicos; e (3) efeitos da interação entre a temperatura e mistura dos agrotóxicos. Os efeitos isolados da temperatura foram analisados considerando a média de todos os grupos (controle e tratados), enquanto os efeitos dos agrotóxicos foram avaliados a partir da média dos grupos mantidos em ambos os regimes de oscilação térmica.

5.2 FLUTUAÇÃO DIÁRIA DA TEMPERATURA DOS AQUÁRIOS

Os grupos controle e experimentais foram submetidos a flutuações diárias de temperatura durante 16 dias de exposição à mistura de agrotóxicos. A Figura 15 apresenta a média diária de temperatura dos aquários, de hora em hora, durante o período experimental de 16 dias. O pico de temperatura ocorreu às 14 horas para ambos os grupos em todos os dias do experimento, horário em que os termostatos eram desligados. Ao longo da noite e da manhã, houve o resfriamento dos aquários até 25 °C, permitindo que os termostatos fossem ligados novamente às 10 horas. Portanto, três grupos apresentaram variação de

25 °C a 28 °C, enquanto outros três grupos variaram de 25 °C a 34 °C, conforme previsto.

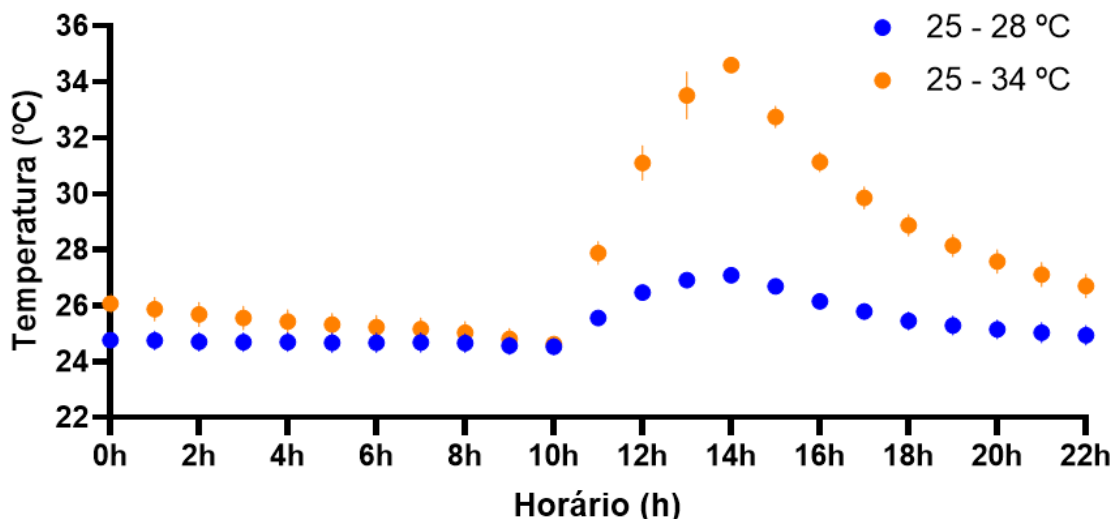


Figura 15 - Média $\pm$ desvio padrão das temperaturas dos aquários ao longo dos 16 dias.

5.3 ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA DOS AQUÁRIOS

As concentrações dos agrotóxicos na água dos aquários, tanto as inicialmente planejadas quanto as efetivamente aplicadas, estão apresentadas na Tabela 2. As concentrações aplicadas foram quantificadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Até o momento, não foi possível analisar o fenoxaprope-*P*-etílico e a cipermetrina, e por esse motivo, as amostras de água serão reanalisadas futuramente com foco nesses compostos.

Tabela 2 - Concentrações dos agrotóxicos detectadas na água dos aquários.

Classe	Princípio ativo	Concentração desejada		Concentração medida	
		Menor ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Maior ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Menor ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Maior ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Herbicida	Bentazona	2,12	17,85	1,06	17,06
	Quincloraque	2,83	5,14	5,27	12,57
	Penoxsulam	2,64	6,53	2,01	6,46
	Imazapique	0,60	0,60	0,54	0,61
	Fenoxaprope- <i>P</i> -etílico	0,72	1,46	-	-
Inseticida	Cipermetrina	0,81	0,81	-	-
	Clorantraniliprole	0,72	3,76	0,82	5,65
Fungicida	Tebuconazol	1,23	2,64	0,31	1,23
	Azoxistrobina	0,70	1,62	0,33	1,59

Fonte: Bitschinski *et al.* (2024); Warsneski *et al.* (2024); dados não publicados.

5.4 ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO E PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

No primeiro e no último dia do experimento, foi determinado o estágio de desenvolvimento dos girinos, conforme a escala de Gosner (Anexo C), e registrados os dados morfométricos referentes ao peso, comprimento total e comprimento da cauda (Tabela 3).

Tabela 3 - Estágio de desenvolvimento, peso, comprimento total e da cauda no tempo inicial e final do experimento (média $\pm$ desvio padrão). Variação (Var.) indica a diferença entre os valores iniciais e finais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre grupos com diferentes flutuações diárias de temperatura. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos de diferentes concentrações de agrotóxicos ($p < 0,05$).

	Estágio de desenvolvimento			Peso (g)			Comprimento total (cm)			Comprimento da cauda (cm)		
	Inicial	Final	Var.	Inicial	Final	Var.	Inicial	Final	Var.	Inicial	Final	Var.
C28	28 $\pm$ 0	29 $\pm$ 0,4	A _{0,8$\pm$0,3}	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	A _{0,2$\pm$0,1}	53 $\pm$ 2,1	58 $\pm$ 3,7	A _{5,3$\pm$2,9}	37 $\pm$ 1,7	43 $\pm$ 1,5	a _{5,6$\pm$1,6}
L28↓	28 $\pm$ 0	29 $\pm$ 0,9	A _{1,4$\pm$0,9}	1 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,1	A _{0,2$\pm$0,1}	53 $\pm$ 2,5	57 $\pm$ 2,8	A _{4,3$\pm$3,1}	36 $\pm$ 1,8	40 $\pm$ 1,7	a _{4,3$\pm$0,2}
H28↑	28 $\pm$ 0	29 $\pm$ 0,4	A _{0,8$\pm$0,4}	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	A _{0,2$\pm$0,1}	52 $\pm$ 3,0	58 $\pm$ 3,2	A _{5,2$\pm$1,9}	37 $\pm$ 2,5	39 $\pm$ 1,9	b _{2,6$\pm$2,4}
C34	28 $\pm$ 0	29 $\pm$ 0,8	B _{1,2$\pm$0,8}	1 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,2	B _{0,3$\pm$0,2}	51 $\pm$ 3,2	59 $\pm$ 3,1	B _{8,1$\pm$2,7}	35 $\pm$ 3,0	40 $\pm$ 3,0	a _{5,1$\pm$2,3}
L34↓	28 $\pm$ 0	30 $\pm$ 1,3	B _{2,0$\pm$0,3}	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,3	B _{0,4$\pm$0,2}	53 $\pm$ 2,3	60 $\pm$ 3,3	B _{7,2$\pm$3,6}	36 $\pm$ 1,8	41 $\pm$ 2,7	a _{4,3$\pm$2,8}
H34↑	28 $\pm$ 0	30 $\pm$ 1,4	B _{1,8$\pm$0,4}	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,3	B _{0,3$\pm$0,2}	54 $\pm$ 2,3	59 $\pm$ 3,2	B _{4,9$\pm$2,3}	37 $\pm$ 1,6	39 $\pm$ 2,3	b _{2,9$\pm$2,3}

Fonte: Autora (2024).

5.4.1 Efeitos da temperatura

O desenvolvimento dos girinos acelerou significativamente nos grupos submetidos às maiores oscilações de temperatura ($p = 0,0094$) (Figura 16A), assim como houve um aumento do peso corporal ($p = 0,0338$) (Figura 16B) e do comprimento total dos animais ($p = 0,0027$) (Figura 16C). O comprimento da cauda não foi influenciado pela temperatura.

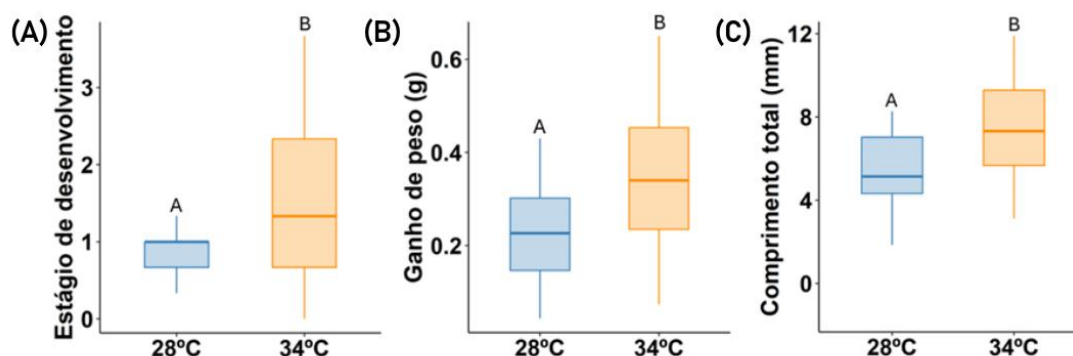


Figura 16 - Efeito da temperatura no estágio de desenvolvimento (A), ganho de peso (B) e comprimento total (C) dos girinos após 16 dias de experimento. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre grupos com diferentes flutuações diárias de temperatura.

5.4.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos

O comprimento da cauda foi reduzido nos grupos expostos às maiores concentrações de agrotóxicos (Figura 17), com diferença significativa entre o grupo de maior concentração com o grupo controle ($p = 0,0022$) e com a menor concentração ($p = 0,0310$). O estágio de desenvolvimento, o peso e o comprimento total dos girinos não foram afetados pela mistura dos agrotóxicos.

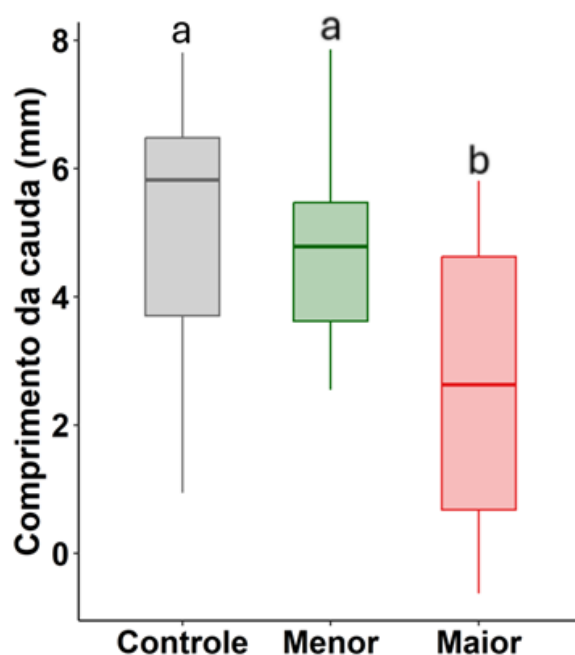


Figura 17 - Efeito da mistura dos agrotóxicos no comprimento da cauda dos girinos. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos de diferentes concentrações de agrotóxicos ($p < 0,05$).

5.4.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura de agrotóxicos

Não foi observado efeito de interação entre os dois fatores em nenhum dos parâmetros analisados.

5.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

5.5.1 Efeitos da temperatura

A atividade das enzimas de biotransformação (CbE e GST), das enzimas antioxidantes (CAT, GR e G6PDH), bem como os níveis de tióis livres totais e de MDA, não foram significativamente afetados pela temperatura. No entanto, os níveis de proteínas carboniladas foram menores no grupo submetido a maiores oscilações térmicas ($p = 0,0253$) (Figura 18A). Além disso, observou-se um aumento significativo na atividade da AChE no músculo dos girinos expostos às variações de temperatura mais elevadas ($p = 0,00022$) (Figura 18B). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na atividade da AChE nas vísceras e na cabeça, assim como na atividade da CbE.

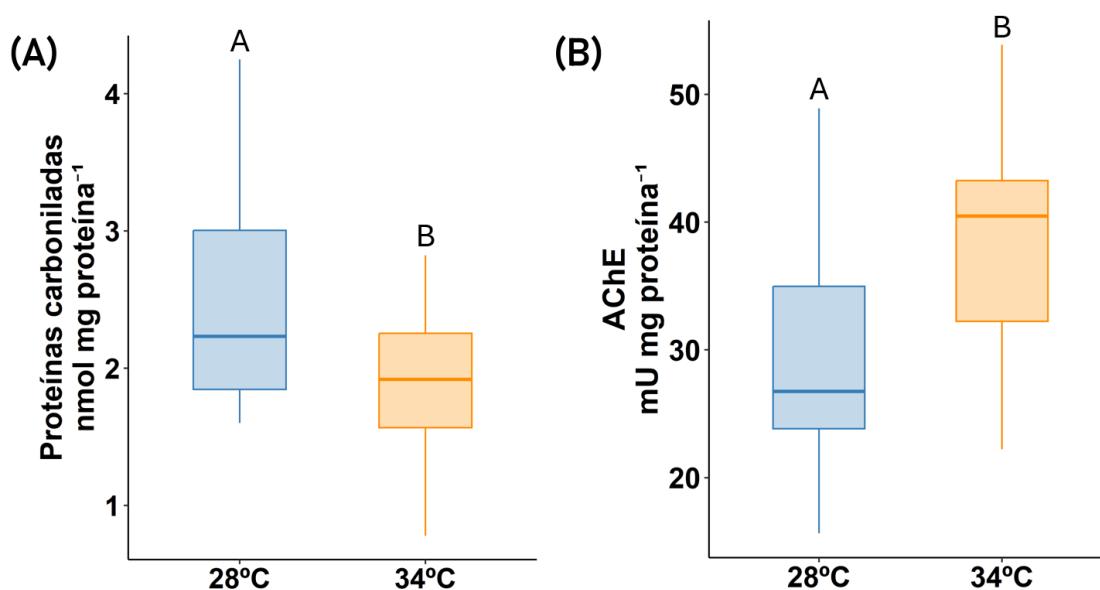


Figura 18 - Efeito da temperatura nos níveis de proteínas carboniladas das vísceras (A) e na atividade da AChE no músculo (B). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre grupos com diferentes flutuações diárias de temperatura ($p < 0,05$).

5.5.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos

Não houve efeito significativo da mistura dos agrotóxicos na atividade da CbE, GST, CAT, G6PDH e nos níveis de tióis livres totais. A atividade da GR aumentou significativamente nas menores ($p = 0,0000047$) e maiores concentrações dos agrotóxicos ($p = 0,00011$) em relação ao controle, assim como houve um aumento significativo dos níveis de MDA ($p = 0,0051$) e uma diminuição das proteínas carboniladas ($p = 0,0175$) nas maiores concentrações (Figura 19A, B, C). No tecido muscular, a atividade da AChE aumentou significativamente na maior concentração dos agrotóxicos em relação à menor concentração ($p = 0,0158$) e ao controle ($p = 0,0223$) (Figura 19D), enquanto a CbE não apresentou diferenças estatísticas nesse órgão. Além disso, não houve alterações na atividade das esterases avaliadas nas vísceras e na cabeça.

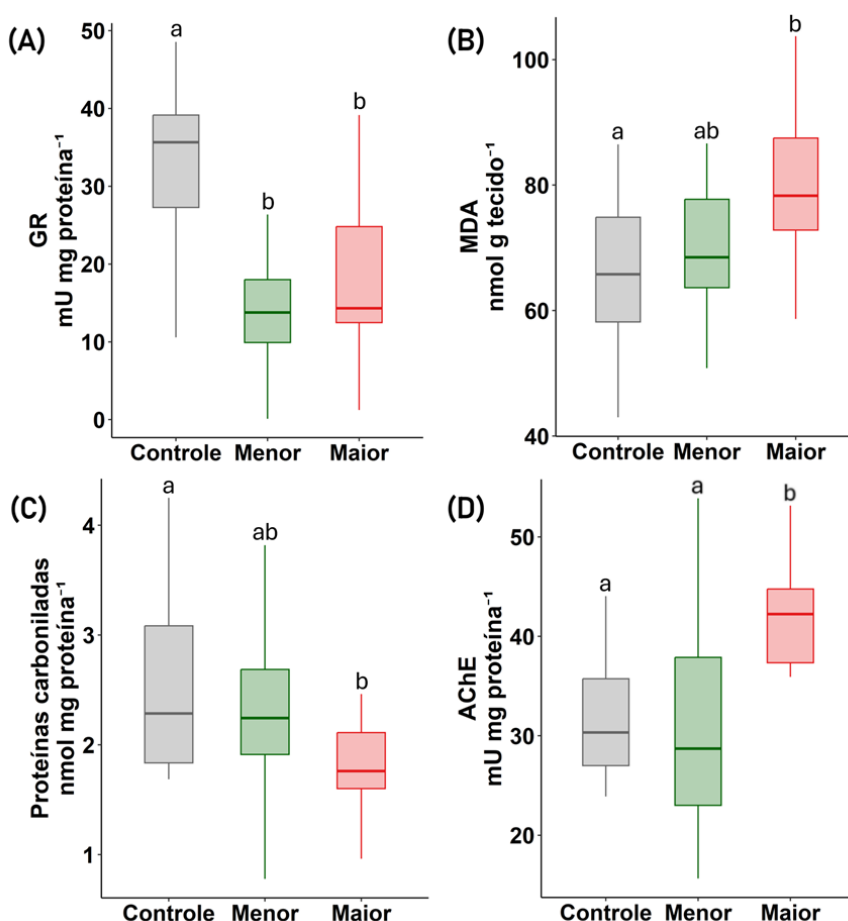


Figura 19 - Efeito da mistura dos agrotóxicos na atividade da GR (A), MDA (B) e proteínas carboniladas (C) nas vísceras; e da AChE no músculo (D). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos de diferentes concentrações de agrotóxicos ($p < 0,05$).

5.5.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura dos agrotóxicos

Não houve efeito da interação entre a temperatura e os agrotóxicos nas enzimas CbE, GST, CAT, GR, G6PDH e AChE, e nos níveis de tióis livres totais, MDA e proteínas carboniladas. Por outro lado, na SOD, houve um efeito de interação entre os grupos controle em diferentes temperaturas, com aumento na atividade da enzima em temperaturas elevadas ($p = 0,0180$). Além disso, a atividade da SOD aumentou significativamente nos grupos de maior temperatura e concentração, demonstrando um efeito de interação entre os dois fatores ($p = 0,0306$). O grupo controle em temperaturas menos elevadas exibiu maior atividade da enzima em comparação ao grupo exposto às menores concentrações de agrotóxicos ($p = 0,0450$). Já em temperaturas mais altas, a atividade da SOD foi significativamente reduzida nos grupos com menores concentrações de agrotóxicos em relação ao controle ($p = 0,0000042$) e às maiores concentrações ($p = 0,0033$) (Figura 20A).

Na GPx, foi identificado um efeito significativo de interação entre as maiores temperaturas e concentrações dos agrotóxicos, apresentando diminuição da atividade da enzima ($p = 0,0316$). Também foram observadas reduções significativas da GPx nos grupos com menor ($p = 0,0045$) e maior concentração ($p = 0,00001$) em comparação ao grupo controle (Figura 20B).

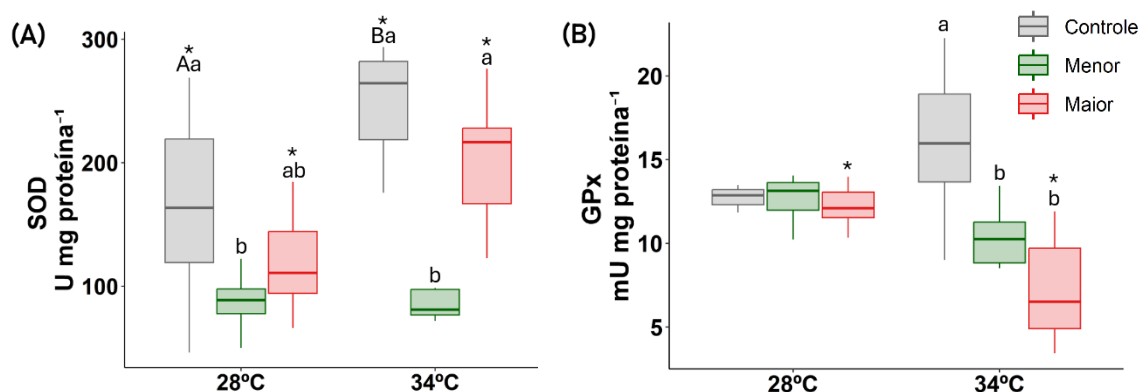


Figura 20 - Efeito de interação nas enzimas SOD (A) e GPx (B). Asteriscos indicam efeito de interação entre os grupos com a mesma concentração de agrotóxicos em diferentes flutuações diárias de temperatura. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre grupos com diferentes flutuações diárias de temperatura. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos de diferentes concentrações de agrotóxicos ($p < 0,05$).

5.6 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Não foram observadas diferenças significativas nos escores de severidade atribuídos para avaliar as alterações histológicas no fígado e na glândula inter-renal dos girinos. O tecido hepático apresentou melanomacrófagos, infiltrados inflamatórios, congestão vascular, acidofilia de hepatócitos e presença de eosinófilos nos grupos controle e nos tratados (Figura 21).

Da mesma forma, o tecido renal apresentou infiltrado inflamatório, congestão vascular e celularidade glomerular em todos os grupos, enquanto a atrofia glomerular foi observada apenas nos grupos controle e tratados com as menores concentrações dos agrotóxicos (Figura 22). No entanto, os valores médios dos escores de severidade não diferem significativamente entre os grupos, conforme Apêndice A.

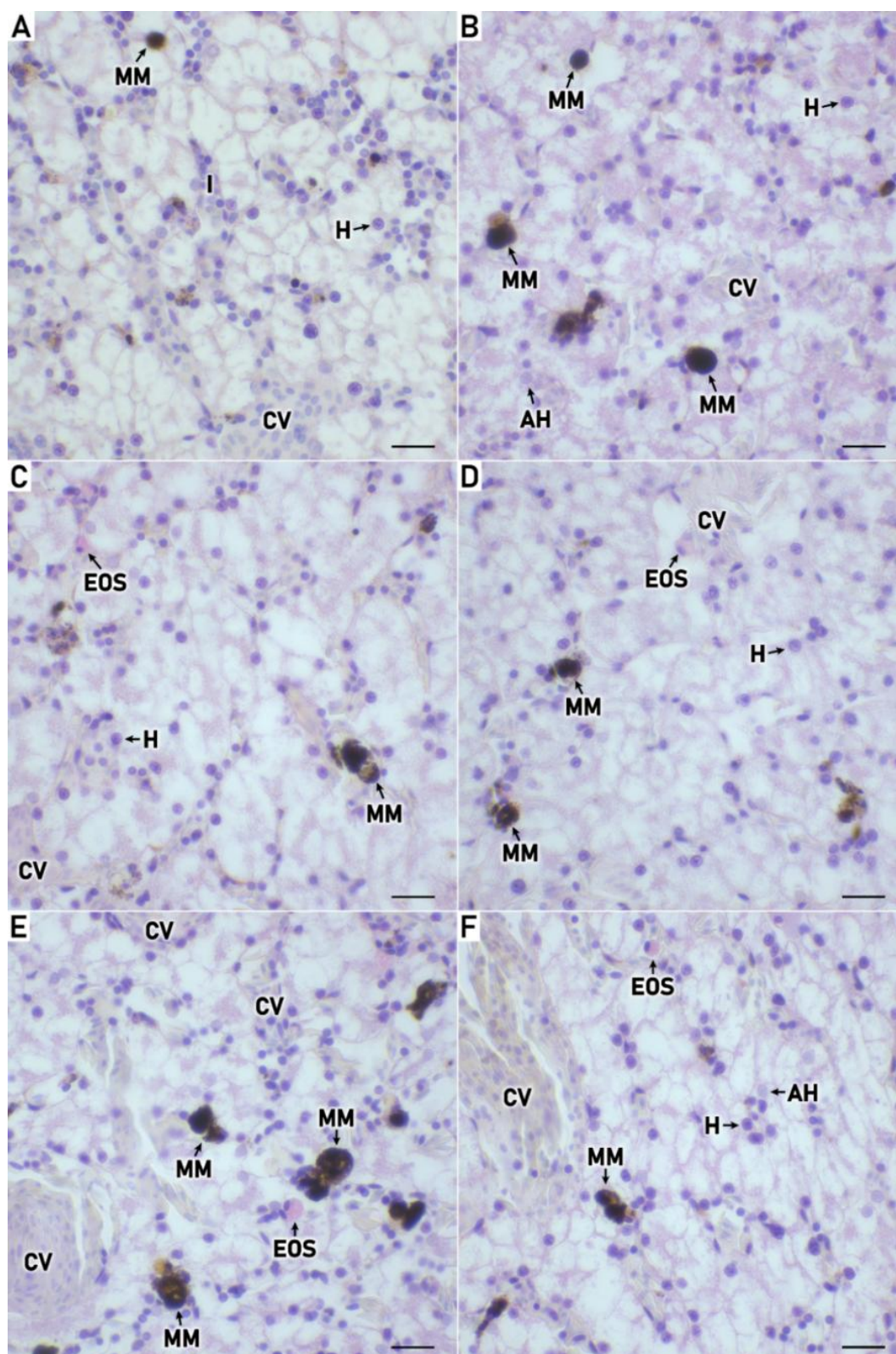


Figura 21 - Fotomicrografias do tecido hepático de girinos de *Boana faber* expostos a uma mistura de agrotóxicos e a diferentes oscilações diárias de temperatura durante 16 dias. C28 (A); C34 (B); L28 (C); H28 (D); L34 (E); e H34 (F). Presença de hepatócitos (H), melanomacrófagos (MM), infiltrados inflamatórios (I), congestão vascular (CV), eosinófilos (EOS) e acidofilia de hepatócitos (AH).

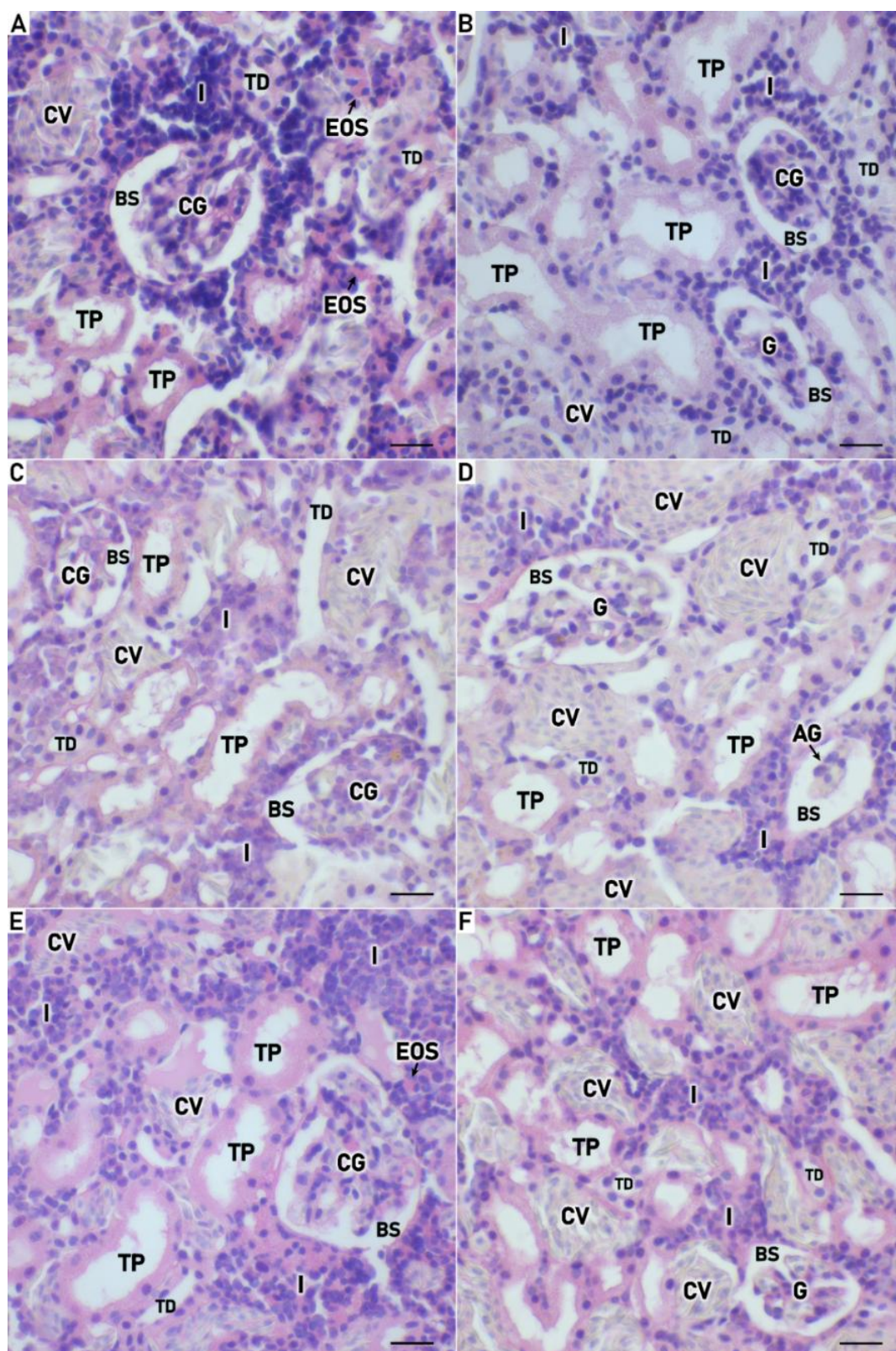


Figura 22 - Fotomicrografias do tecido renal de girinos de *Boana faber* expostos a uma mistura de agrotóxicos e a diferentes oscilações diárias de temperatura durante 16 dias. C28 (A); C34 (B); L28 (C); H28 (D); L34 (E); e H34 (F). Presença de túbulo contorcido distal (TD) e proximal (TP), glomérulo renal (G), celularidade glomerular (CG), espaço Bowman (BS), infiltrados inflamatórios (I), congestão vascular (CV) e eosinófilos (EOS).

5.7 PARÂMETROS GENOTÓXICOS

5.7.1 Efeitos da temperatura

Nos grupos expostos às maiores flutuações de temperatura, houve um aumento significativo no número de células anucleadas ($p = 0,00027$) e de eritrócitos com núcleo lobado ($p = 0,0366$) (Figura 23A, B). As demais anormalidades nucleares eritrocitárias, assim como a presença de eritrócitos imaturos, não apresentaram diferença estatística em relação a temperatura.

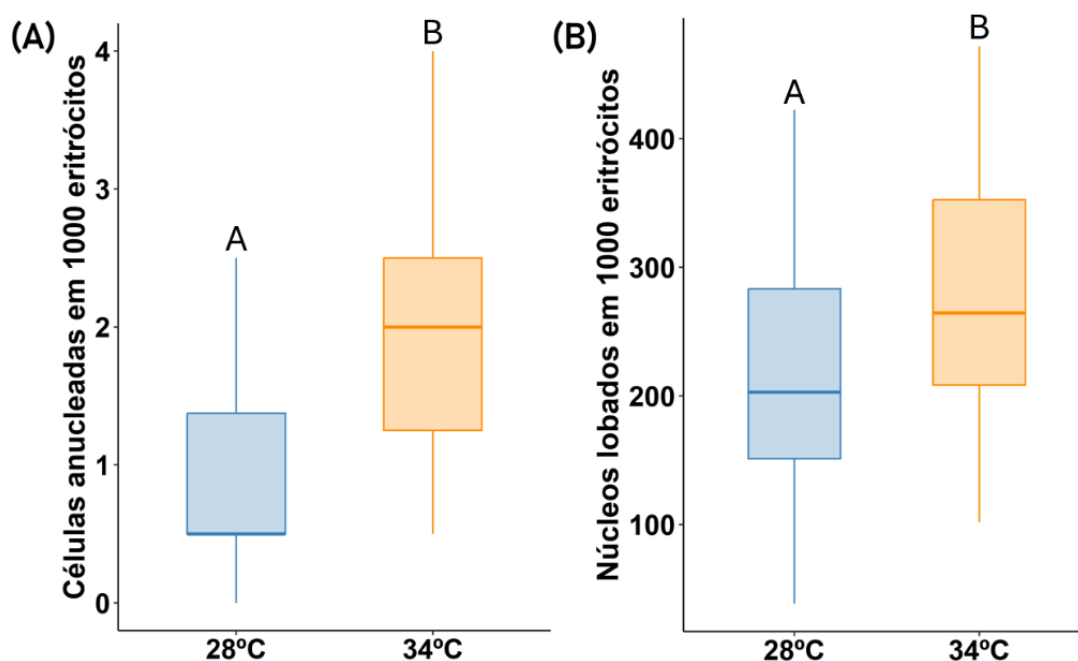


Figura 23 - Efeito da temperatura na frequência de células anucleadas (A) e de eritrócitos com núcleo lobado (B) em uma contagem de 1000 eritrócitos. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre grupos com diferentes flutuações diárias de temperatura ($p < 0,05$).

5.7.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos

Não foi observado efeito da mistura dos agrotóxicos em nenhum dos parâmetros analisados.

5.7.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura dos agrotóxicos

Não houve efeito de interação entre os fatores em nenhum dos parâmetros analisados.

5.8 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

5.8.1 Efeitos da temperatura

O número de eosinófilos aumentou ($p = 0,0073$) e o de basófilos diminuiu ($p = 0,0004$) nos grupos expostos às maiores oscilações de temperatura (Figura 24A, B). Os demais leucócitos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à temperatura.

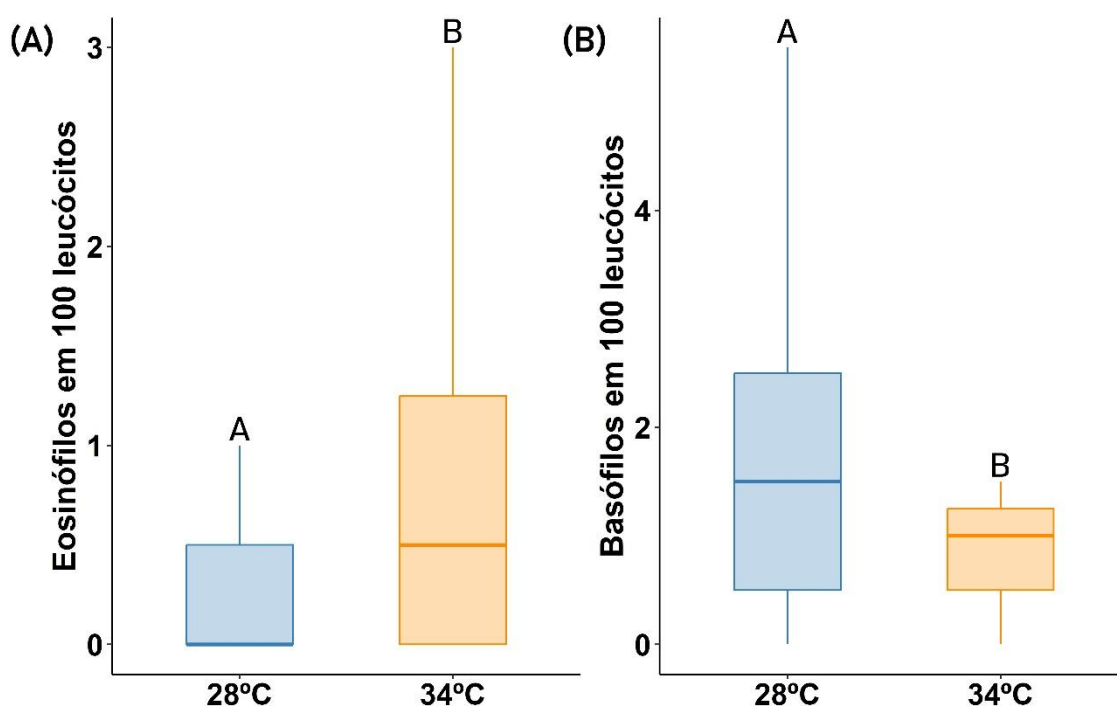


Figura 24 - Efeito da temperatura no número de eosinófilos (A) e basófilos (B) em uma contagem de 100 leucócitos. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre grupos com diferentes flutuações diárias de temperatura ($p < 0,05$).

5.8.2 Efeitos da mistura dos agrotóxicos

Observou-se uma redução significativa no número de basófilos nos grupos expostos às menores ($p = 0,00025$) e maiores concentrações ($p = 0,00045$) da mistura de agrotóxicos em comparação ao grupo controle (Figura 25). Os demais leucócitos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas frente à exposição aos agrotóxicos.

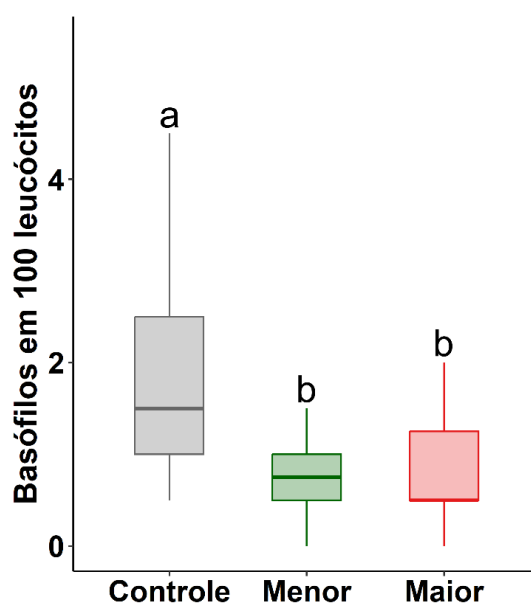


Figura 25 - Efeito da mistura dos agrotóxicos no número de basófilos em uma contagem de 100 leucócitos. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os grupos de diferentes concentrações de agrotóxicos ($p < 0,05$).

5.8.3 Efeitos da interação entre a temperatura e a mistura dos agrotóxicos

Não houve efeito de interação entre os fatores em nenhum dos parâmetros analisados.

5.9 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Para melhor ilustrar os conjuntos de dados obtidos, o Quadro 5 apresenta os principais resultados encontrados para os parâmetros analisados.

Quadro 5 - Resumo dos resultados obtidos neste estudo.

(continua)

Categoria	Parâmetro	Temperatura	Agrotóxicos	Interação
Desenvolvimento	Estágio de desenvolvimento	↑	—	—
Morfometria	Peso	↑	—	—
	Comprimento total	↑	—	—
	Comprimento da cauda	—	↓	—
Bioquímica	GST	—	—	—
	SOD	↑	↓	↑
	CAT	—	—	—
	GPx	—	↓	↓
	Tióis livres totais	—	—	—
	GR	—	↓	—
	G6PDH	—	—	—
	MDA	—	↑	—
	Proteínas carboniladas	↓	↓	—
	CbE (vísceras)	—	—	—
	CbE (cabeça)	—	—	—
	AChE (vísceras)	—	—	—
	AChE (cabeça)	—	—	—
	AChE (músculo)	↑	↑	—
Histologia	Tecido hepático	—	—	—
	Tecido renal	—	—	—
Genotoxicidade	Micronúcleo	—	—	—
	Núcleo bolhoso	—	—	—
	Núcleo lobado	↑	—	—
Genotoxicidade	Núcleo entalhado	—	—	—
	Célula binucleada	—	—	—
	Célula anucleada	↑	—	—
	Célula imatura	—	—	—

(conclusão)				
Imunologia	Linfócitos	—	—	—
	Monócitos	—	—	—
	Neutrófilos	—	—	—
	Eosinófilos	↑	—	—
	Basófilos	↓	↓	—
	Trombócitos	—	—	—

Fonte: Autora (2025).

6. DISCUSSÃO

Alterações ambientais, como o aumento da temperatura e a presença de poluentes, podem afetar a homeostase, o sistema imunológico e o desenvolvimento de anfíbios. Neste contexto, este estudo investigou como a interação entre agrotóxicos e flutuações térmicas influenciam parâmetros morfológicos, bioquímicos, histológicos, genotóxicos e imunológicos em girinos de *B. faber*. Apesar da exposição a estressores ambientais, a ausência de mortalidade indica que os 16 dias de experimento não foram suficientes para que as temperaturas elevadas e a toxicidade da mistura de agrotóxicos resultassem em efeitos letais. Fatores ambientais, como a temperatura, influenciam diretamente a metamorfose dos anfíbios, podendo gerar alterações morfológicas e fisiológicas que se mantêm na fase adulta e comprometem a sua sobrevivência.

Nos grupos expostos a flutuações mais elevadas de temperatura foi observado um desenvolvimento significativamente mais acelerado que o dos girinos em flutuações menores de temperatura, associado a um maior crescimento corporal e ganho de peso. Resultados semelhantes foram encontrados em diferentes espécies, como *Rana sphenoccephala* (Ohmer *et al.*, 2023), *Lithobates pipiens* (Curtis; Bidart, 2021) e *Pleurodema doliolister* (Maciel; Juncá, 2009), nas quais o aumento da temperatura acelerou a metamorfose. Essa aceleração pode não ser benéfica devido ao menor tempo para o desenvolvimento de indivíduos adultos resistentes e com tamanho e peso adequados. Além dos efeitos no desenvolvimento, estudos demonstraram também um aumento da taxa de crescimento dos animais conforme o aumento da temperatura, como relatado para *Rhinella granulosa* em 33 °C (Maciel; Juncá, 2009) e *Rana kukunoris* em 24 °C, quando comparado a 12 °C e 18 °C (Niu *et al.*, 2024), corroborando os resultados deste estudo.

O comprimento da cauda dos girinos foi reduzido com a exposição à mistura de agrotóxicos, o que poderia sugerir aceleração da metamorfose, uma vez que ocorre a reabsorção da cauda neste processo. Entretanto, não foram observados efeitos das misturas de agrotóxicos sobre o desenvolvimento, o que

sugere que os girinos possam estar utilizando as reservas energéticas da cauda para lidar com a intoxicação, sem que isso esteja associado a seu desenvolvimento. Resultados semelhantes foram observados em girinos de *Bufo bufo* expostos a 1,5, 3 e 4 mg·L⁻¹ do herbicida glifosato, onde o tamanho da cauda dos girinos foi maior no grupo controle do que nos grupos tratados (Baier *et al.*, 2016). Entretanto, a maioria dos estudos foca na análise de malformações e outros parâmetros morfológicos (Bolis *et al.*, 2020), enquanto o comprimento da cauda ainda não é muito explorado. Por exemplo, malformações da cauda foram relatadas em girinos de *Hyla intermedia* expostos a 50 mg·L⁻¹ de tebuconazol (Bernabò *et al.*, 2016), e em *Physalaemus gracilis* expostos à 1, 1,5 e 2 mg·L⁻¹ de cipermetrina. Além disso, a atividade natatória de girinos de *P. gracilis* foi comprometida em concentrações acima de 0,05 mg·L⁻¹ de cipermetrina (Slaviero, 2017). A combinação da redução precoce da cauda, em decorrência de efeitos de agrotóxicos, associada a metamorfose acelerada devido ao aumento da temperatura, pode comprometer o desenvolvimento dos girinos, tornando-os vulneráveis a predadores por problemas na locomoção, por exemplo. Além disso, um eventual consumo precoce da cauda do animal poderia implicar em menos recursos energéticos disponíveis para o desenvolvimento durante o início da metamorfose.

A atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, pode ser afetada por agrotóxicos e temperaturas elevadas. A exposição de *Lithobates catesbeianus* a tebutiuram (Grott *et al.*, 2021) e ametrina (Grott *et al.*, 2022b), ambos na concentração de 200 ng·L⁻¹, resultou em redução da atividade da SOD sob temperatura elevada (32 °C). No entanto, no estudo com tebutiuram, os níveis transcritos de SOD foram superiores nos girinos expostos à concentração de 200 ng·L⁻¹ em comparação aos expostos a 10 ng·L⁻¹. Esses achados condizem com os resultados obtidos neste trabalho, onde se observou uma diminuição da atividade da SOD nas concentrações mais baixas da mistura de agrotóxicos, enquanto as concentrações mais elevadas apresentaram um aumento na atividade da enzima. Esse padrão de resposta pode indicar que houve um impacto abrupto no sistema antioxidante, que reduziu a atividade da SOD nos grupos tratamento de menor concentração. Já nas concentrações mais

elevadas, a atividade enzimática foi maior como uma tentativa de alcançar o equilíbrio redox.

Em um estudo com girinos de *Rana kukunoris* sobre os efeitos da radiação UV-B em temperaturas elevadas, observou-se um aumento na atividade da SOD em 22 °C, quando comparado a 14 °C (Tang *et al.*, 2022). Embora estas temperaturas sejam menores do que as utilizadas neste trabalho (28 °C e 34 °C), o padrão da resposta enzimática foi semelhante, visto que a atividade da SOD foi maior conforme o aumento da temperatura. Além disso, houve efeito de interação entre os dois fatores, em que a elevação da temperatura na maior concentração da mistura de agrotóxicos potencializou a atividade da SOD. Do mesmo modo, Freitas *et al.* (2017) relataram que a interação entre temperatura elevada (32 °C) e exposição à sulfentrazona (0,1 mg·L⁻¹) aumentou a atividade da SOD em girinos de *Rhinella schneideri* em comparação ao controle mantido a 28 °C.

Embora a atividade da SOD tenha aumentado em resposta à maior concentração da mistura de agrotóxicos sob temperatura elevada, a CAT não apresentou alterações significativas. Isso sugere que, apesar do aumento na conversão de O₂⁻ em H₂O₂ pela SOD, a remoção desse peróxido não foi regulada pela CAT. Reichert *et al.* (2022) também não observaram alterações na atividade da CAT em girinos de *Rhinella icterica* expostos a 10, 20 e 40 µg·L⁻¹ de quincloraque. Por outro lado, a GPx diminuiu significativamente nas maiores concentrações da mistura de agrotóxicos combinadas às temperaturas elevadas, além de também apresentar uma redução em ambas as concentrações quando comparadas ao grupo controle. Estudos com girinos de *Bufo regularis* expostos ao herbicida Butaforce® (7, 9 e 11 µg·L⁻¹) e ao inseticida Termex® (15, 20 e 25 µg·L⁻¹) também apresentaram redução da GPx (Ejilibe *et al.*, 2018). Essa diminuição pode estar relacionada à alteração da GR observada neste estudo. A GSH atua como cofator da GPx, enquanto a GR é responsável pela redução da glutatona. Consequentemente, a menor atividade da GR compromete os níveis de GSH disponível e afeta negativamente a GPx (Lushchak, 2011). Apesar disso, a atividade da G6PDH, que mantém os níveis de NADPH utilizados pela GR, não foi afetada, assim como não houve alteração nos níveis de tióis livres totais.

Portanto, a atividade alterada da GR é possivelmente resultante da inibição da enzima pela mistura de agrotóxicos, e não pela falta de cofatores.

A exposição aos agrotóxicos induziu peroxidação lipídica nos girinos, com aumento significativo dos níveis de MDA nas maiores concentrações em comparação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram descritos por David *et al.* (2012), que observaram aumento do MDA em girinos de *Duttaphrynus melanostictus* expostos à cipermetrina ($3,1 - 5,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), e por Freitas *et al.* (2017), em girinos de *Physalaemus nattereri* expostos a sulfentrazona ($0,05$ e $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) nas temperaturas de 28°C e 32°C . Da mesma forma, Bitschinski *et al.* (2024) relataram aumento nos níveis de MDA em girinos de *Boana faber* expostos à mistura de bentazona, clorantraniliprole e tebuconazol ($17,85$; $3,76$; $2,64 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente). Por outro lado, o estresse térmico causado por oscilações de temperatura, não afetou os níveis de MDA ao longo dos 16 dias de experimento, divergindo do observado por Freitas *et al.* (2017), que utilizaram temperaturas elevadas constantes. É possível inferir que as oscilações de temperatura testadas em nosso experimento promovem períodos de maior e menor estresse (maiores e menores temperaturas) ao longo do dia, o que possibilitaria condições mais propícias nos momentos de queda da temperatura para que o animal se recupere de eventuais estresses decorrentes das temperaturas mais elevadas, balanceando de forma eficaz seu estado redox e assim evitando o estresse oxidativo. Em temperaturas elevadas constantemente, como no trabalho de Freitas *et al.* (2017), a condição fisiológica é seguramente mais desgastante, dificultando os ajustes redox necessários para evitar os efeitos deletérios das EROs.

Os níveis de proteínas carboniladas reduziram significativamente nos grupos expostos à maior temperatura e às maiores concentrações dos agrotóxicos, representando um efeito isolado desses estressores. Diferente do observado, girinos de *Boana faber* sob exposição de azoxistrobina ($0,70$ e $1,60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), tebuconazol ($1,20$ e $2,60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e uma mistura dos dois agrotóxicos, apresentaram aumento da carbonilação de proteínas (Bitschinski *et al.*, 2024; Warsneski *et al.*, 2024). No entanto, resultados semelhantes aos deste estudo foram relatados por Reichert *et al.* (2022, 2023), que observaram redução nos níveis de proteínas carboniladas em girinos de *Rhinella icterica* expostos a

atrazina (20 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e à mistura de atrazina e quincloraque (20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). O aumento do MDA, e não das proteínas carboniladas, pode indicar uma resposta biológica para remoção dos compostos carbonílicos das proteínas, por meio da ativação de mecanismos proteolíticos, como sugerido por Reichert *et al.* (2023).

A atividade enzimática da GST e da CbE não foi alterada nas vísceras, e no caso da CbE, também não houve alteração na cabeça. De forma semelhante, girinos de *Boana faber* expostos à bentazona (2,1 e 17,9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e à cipermetrina (0,7 e 3,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) não apresentaram alterações nessas enzimas no fígado (Bitschinski *et al.*, 2024). Por outro lado, a GST aumentou quando expostos à azoxistrobina (0,70 e 1,60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e tebuconazol (2,60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto a CbE apresentou aumento apenas na maior concentração de azoxistrobina (1,60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Warsneski *et al.*, 2024).

A atividade da AChE não foi alterada na região da cabeça, indicando que a mistura dos agrotóxicos não causou efeitos neurotóxicos em *B. faber*. Esse resultado corrobora os achados de Bitschinski *et al.* (2024) e Warsneski *et al.* (2024), que também não observaram alterações na atividade da AChE em girinos expostos às mesmas concentrações citadas acima de azoxistrobina, tebuconazol, cipermetrina e bentazona. Por outro lado, a AChE muscular apresentou aumento significativo da atividade enzimática neste estudo, tanto na maior concentração da mistura quanto nas oscilações térmicas mais intensas.

A temperatura, por si só, é capaz de causar alterações na atividade da AChE, conforme demonstrado por Carneiro *et al.* (2023) e Grott *et al.* (2021), que relataram aumento da AChE hepática em girinos de *L. catesbeianus* expostos a 2-hidroxiatrazina e tebutiuram em temperaturas de 25 °C e 32 °C. Da mesma forma, Johnson *et al.* (2005) observaram maior atividade da AChE em girinos de *Hyla regilla* criados a 19 °C em comparação àqueles mantidos a 8 °C, demonstrando mais uma vez que temperaturas elevadas tendem a aumentar a atividade enzimática da AChE.

Apesar de não ter sido observado uma interação entre temperatura e agrotóxicos, o aumento da AChE muscular de forma isolada pode estar associado a uma maior frequência de contrações musculares e atividade natatória mais intensa, como sugerido por Warsneski *et al.* (2024), que

observaram os mesmos resultados com girinos de *B. faber* expostos à azoxistrobina e tebuconazol. Uma maior atividade muscular consome mais oxigênio, e conseqüentemente, gera mais EROs que precisam ser neutralizadas pelo sistema antioxidante. Desse modo, estudos com enfoque comportamental seriam relevantes para verificar possíveis alterações locomotoras associadas à elevação da atividade da AChE

A redução da cauda durante a metamorfose dos anuros ocorre por meio de mecanismos de apoptose. Uma relação pode existir entre o aumento da atividade da AChE muscular e a diminuição do comprimento da cauda, observada de forma mais acentuada nos girinos expostos à mistura de agrotóxicos. A cauda encurtada pode exigir maior esforço físico para a realização de movimentos natatórios, elevando a frequência de contrações musculares, e conseqüentemente, estimulando a produção de AChE para modular essa atividade. Além disso, a AChE tem sido associada a processos de apoptose, sugerindo que o aumento de sua atividade pode influenciar a indução da morte celular nos miócitos durante a reabsorção da cauda (Ye *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2002).

Embora os multiestressores tenham provocado alterações na atividade da AChE, em enzimas antioxidantes e em marcadores de lesão, o período experimental não foi suficiente para causar danos histopatológicos no fígado e na glândula inter-renal dos girinos. Em estudo anterior, o tecido renal de *L. catesbeianus* exposto durante 16 dias à 2-hidroxiatrazina (10, 50 e 200 ng·L⁻¹) a 25 °C e 32 °C apresentou maiores escores de severidade nos grupos submetidos ao agrotóxico e à temperatura elevada (Carneiro *et al.*, 2023). Entre as alterações observadas estavam a atrofia glomerular e a presença de infiltrados inflamatórios, os quais também foram considerados nos critérios para a análise histológica deste trabalho. Em relação ao fígado, Bitschinski *et al.* (2024) observaram que o tecido hepático de *B. faber* exposto a tebuconazol (1,2 e 2,6 µg·L⁻¹) e cipermetrina (3,8 µg·L⁻¹) apresentou maiores escores de severidade em relação ao controle, indicando que girinos de vida livre podem sofrer danos histopatológicos sob exposição a esses agrotóxicos. Apesar disso, a exposição à mistura de bentazona (que isoladamente não causou alterações), tebuconazol e cipermetrina não resultou em lesões hepáticas, sugerindo um efeito antagônico

da combinação de agrotóxicos em relação às substâncias isoladas (Bitschinski *et al.*, 2024). Os escores de severidade utilizados por Bitschinski *et al.* (2024) incluíram a presença de infiltrados inflamatórios, congestão vascular e melanomacrófagos, os quais também foram considerados como critérios da análise histológica do fígado neste trabalho.

Temperaturas mais altas alteraram parâmetros genotóxicos nos girinos de *B. faber*, provocando um aumento na frequência de eritrócitos anucleados e com núcleo lobado. Tais alterações não foram observadas por Carneiro *et al.* (2023) e Grott *et al.* (2021, 2022b) em girinos de *L. catesbeianus* expostos a temperaturas constantes de 25 °C e 32 °C, sugerindo uma maior capacidade da espécie exótica em evitar danos genotóxicos. Além disso, flutuações térmicas diárias podem causar mais danos no DNA do que a exposição a temperaturas elevadas constantes (Verheyen *et al.*, 2022), o que reforça a importância de se considerar oscilações ambientais realistas em estudos de ecotoxicologia, especialmente diante da escassez de informações sobre a influência de fatores abióticos nos efeitos genotóxicos em anfíbios.

Considerando essa limitação, uma hipótese para o aumento das alterações nucleares é a maior taxa de divisão celular causada pelo aumento do metabolismo basal em altas temperaturas. Com a alta demanda energética devido ao estresse térmico, o organismo tem menos energia disponível para mecanismos de reparação (Rollins-Smith; Le Sage, 2023). Quanto mais células se dividem, maior a chance de erros que levam ao surgimento de anormalidades nucleares eritrocitárias, como as células anucleadas e com núcleo lobado. No entanto, os mecanismos de formação específicos de cada anormalidade nuclear ainda não são totalmente compreendidos, o que dificulta estabelecer relações entre essas alterações e a ausência de efeito sobre outros tipos de anormalidades, como micronúcleos, núcleos bolhosos, entalhados, binucleados e células imaturas.

Apesar dos efeitos genotóxicos causados pelas oscilações térmicas, os agrotóxicos não induziram genotoxicidade neste estudo. Em *L. catesbeianus*, Jing *et al.* (2017) observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos apenas nos girinos expostos ao ácido fenoxaprope ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),

que é um metabólito do herbicida fenoxaprope-etílico, o qual não gerou anormalidades. Já em *Leptodactylus latinasus*, houve um aumento no número de núcleos lobados nos girinos expostos ao herbicida imazetapir (Pivot®, 0,22 mg·L⁻¹), que pertence ao grupo químico das imidazolinonas, assim como o imazapique presente na mistura de agrotóxicos utilizada neste trabalho (Pérez-Iglesias *et al.*, 2020).

O sistema imune demanda de muita energia para se manter em funcionamento (Bonneaud *et al.*, 2003), podendo ser afetado pelas altas temperaturas devido ao maior custo energético. Uma imunidade dependente de temperatura pode ser um mecanismo para economizar a energia de animais ectotérmicos em ambientes frios, visto que no calor a suscetibilidade à infecção por patógenos e parasitas aumenta, ativando o sistema imune (Raffel *et al.*, 2006). Nesse sentido, as maiores oscilações térmicas sobrecarregam o sistema imunológico tornando os animais mais vulneráveis.

Apesar de não haver função reconhecida para essas células no corpo dos anfíbios, os eosinófilos e basófilos respondem a reações de hipersensibilidade e foram os únicos leucócitos com alterações neste estudo. Ambos apresentaram diferenças estatísticas em relação a temperatura, no entanto, enquanto houve um aumento de eosinófilos, o número de basófilos reduziu nas maiores oscilações de temperatura. Em um estudo com *Rana pipiens*, os girinos mantidos durante 5 meses a 5 °C apresentaram um menor número de eosinófilos em comparação aos expostos a 22 °C (Maniero; Carey, 1997), corroborando com a hipótese de que em maiores temperaturas há um aumento na demanda do sistema imune, apesar do número de basófilos não ter sofrido alteração. Já os girinos de *Polypedates cruciger* não apresentaram diferença no número de eosinófilos e basófilos nos grupos expostos a 29 °C em comparação aos expostos a 32 °C (Weerathunga; Rajapaksa, 2020), o que pode sugerir que a diferença entre as temperaturas estudadas é muito sutil para apresentar alterações nos leucócitos.

Contrariando a hipótese de que temperaturas elevadas aumentam a quantidade de células do sistema imune, observou-se uma diminuição no número de basófilos dos girinos expostos à maiores oscilações térmicas.

Embora os mecanismos associados a essa redução ainda não estejam descritos para anfíbios, evidências em humanos sugerem que altos níveis de hormônios tireoidianos podem afetar a contagem de basófilos. Inagaki (1957) observou uma redução no número de basófilos circulantes em 20 de 27 homens com tireotoxicose, assim como Thonnard-Neumann (1961) relatou o mesmo em cinco de seis mulheres com hipertireoidismo.

No entanto, estudos com anfíbios expostos a temperaturas elevadas e agrotóxicos não relataram alterações na contagem de basófilos. Tal redução é considerada incomum, dado que essas células já estão naturalmente em menor quantidade no sangue (George-Gay; Parker, 2003). Uma possível explicação é a migração dos basófilos da corrente sanguínea para outros tecidos, onde atuam em resposta ao estresse (Juhlin, 1963) induzido pela exposição a oscilações térmicas e uma mistura de agrotóxicos. Esses resultados indicam que o sistema imune da *Boana faber* é sensível tanto aos poluentes quanto às flutuações de temperatura mais intensas, apresentando respostas que ainda são pouco compreendidas e que precisam ser investigadas em estudos futuros.

7. CONCLUSÕES

Fatores abióticos influenciam diretamente o metabolismo e o desenvolvimento dos anfíbios, impactando negativamente sua homeostase tanto na fase larval quanto na fase adulta. Neste estudo, oscilações térmicas provocaram mais alterações nos biomarcadores avaliados do que a própria exposição à mistura de agrotóxicos. As hipóteses H1 e H3 foram confirmadas, visto que apesar da ausência de lesões histológicas, o desenvolvimento, a morfologia e os parâmetros bioquímicos, genotóxicos e imunológicos foram afetados negativamente pelas altas temperaturas e os agrotóxicos, embora os níveis de proteínas carboniladas tenham diminuído. Já a hipótese H2, referente à interação entre a temperatura e os agrotóxicos, foi confirmada somente para as enzimas SOD e GPx, enquanto os demais parâmetros sofreram apenas efeitos independentes. Por fim, este trabalho inovou ao implementar um protocolo para simular flutuações térmicas diárias, um fator ambiental que ainda é pouco explorado em pesquisas sobre temperatura, mas que é de extrema relevância para compreender os impactos ambientais em condições mais próximas das encontradas em ambientes naturais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. Rio De Janeiro (Rj): Elsevier, 2014.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.

AGROFIT. **Cyprin 250 CE**. 2023. Disponível em: <https://www.atermais.digital.cnptia.embrapa.br/web/controle-de-pragas/w/cyprin-250-ce-sumitomo-chemical-brasil-ind%C3%BAstria-qu%C3%ADmica-s.a.-6395-3>. Acesso em: 06 nov. 2024.

AGROLINK. **Ampligo**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/ampligo_8365.html. Acesso em: 06 nov. 2024.

AGROLINK. **Podium EW**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/podium-ew_7610.html. Acesso em: 06 nov. 2024

AGROLINK. **Ricer**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/ricer_6570.html. Acesso em: 06 nov. 2024.

AGROLINK. **Tebuconazole CCAB 200 EC**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/tebuconazole-ccab-200-ec_8693.html. Acesso em: 06 nov. 2024.

ALLENDER, M. C.; FRY, M. M. Amphibian hematology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 463-480, 2008.

ALMEIDA, E. A.; MIYAMOTO, S.; BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5-6, p. 386-392, 2004.

ALVES-FERREIRA, G.; FORTUNATO, D. S.; KATZENBERGER, M.; FAVA, F. G.; SOLÉ, M. Effects of temperature on growth, development, and survival of amphibian larvae: macroecological and evolutionary patterns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, n. 2, p. e20230671, 2024.

ANA. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. **Levantamento da agricultura irrigada por pivôs centrais no Brasil - 1985-2022**. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/noticias-e-eventos/noticias/ana-e-inpe-lancam-boletim-sobre-mapeamento-do-arroz-irrigado-e-portal-que-reune-informacoes-sobre-irrigacao-no-brasil-em-30-de-abril>. Acesso em: 07 jul. 2025.

AMPHIBIAWEB. **Boana faber**. blacksmith treefrog. 2023. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/species/792>. Acesso em: 14 abr. 2025.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 2080, de 31 de julho de 2019. 147. ed. Brasília, 01 ago. 2019. Seção 1, p. 94.

ASHAF-UD-DOULAH, M.; SHAHJAHAN, M.; ISLAM, S. M. M.; AL-EMRAN, M.; RAHMAN, M. S.; HOSSAIN, M. A. R. Thermal stress causes nuclear and cellular abnormalities of peripheral erythrocytes in Indian major carp, rohu *Labeo rohita*. **Journal of Thermal Biology**, v. 86, p. 102450, 2019.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)**. Rio de Janeiro, 2016.

ATKINSON, D. Temperature and organism size - a biological law for ectotherms? **Advances in Ecological Research**, v. 25, p. 1-58, 1994.

BACH, N. C.; MARINO, D. J. G.; NATALE, G. S.; SOMOZA, G. M. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 202, p. 289-297, 2018.

BAIER, F.; GRUBER, E.; HEIN, T.; BONDAR-KUNZE, E.; IVANKOVÍK, M.; MENTLER, A.; BRÜHL, C. A.; SPANGL, B.; ZALLER, J. G. Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. **PeerJ**, v. 4, p. e2641, 2016.

BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, M. E. G.; DI MASCIO, P.; ALMEIDA, E. A. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the Perna perna mussel's digestive gland. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 35-39, 2006.

BARBHUIYA, S. N.; PAUL, D.; FARZANA, N.; DEVI, A. R.; SINGHA, U.; BARHOI, D. Exposure to chlorantraniliprole leads to genotoxicity and behavioural changes in *Fejervarya limnocharis* tadpoles: an in vivo approach. **Journal Of Bioresources**, v. 12, n. 2, p. 84-88, 2024.

BASF. **Basagran® 600**: bula e informações do herbicida para arroz. Bula e Informações do Herbicida para arroz. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/basagran-600>. Acesso em: 06 nov. 2024.

BASF. **Facet**: bula e informações do herbicida para arroz. Bula e Informações do Herbicida para Arroz. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/facet>. Acesso em: 06 nov. 2024.

BASF. **Plateau**: bula e informações do herbicida para cana-de-açúcar. Bula e Informações do Herbicida para cana-de-açúcar. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/plateau>. Acesso em: 06 nov. 2024.

BECKER, C. G.; LONGO, A. V. Longo; HADDAD, C. F. B.; ZAMUDIO, K. R. Land cover and forest connectivity alter the interactions among host, pathogen and skin microbiome. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1861, p. 20170582, 2017.

BENVINDO-SOUZA, M.; OLIVEIRA, E. A. S.; ASSIS, R. A.; SANTOS, C. G. A.; BORGES, R. E.; E SILVA, D. D. M.; SANTOS, R. L. S. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, p. 124910, 2020.

BERNABÒ, I.; GUARDIA, A.; MACIRELLA, R.; SESTI, S.; CRESCENTE, A.; BRUNELLI, E. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 56-66, 2016.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLIET, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. **Improved method for determination of blood glutathione**. 1963.

BITSCHINSKI, D.; WARSNESKI, A.; RUTKOSKI, C. F.; GONÇALVES, G. H. P.; GIASSON, L. O. M.; HASCKEL, R. P.; ISRAEL, N. G.; DA SILVA, E. B.; DE ALBUQUERQUE, C. A. C.; LÃ, L.; ALVES, T. C.; GUERREIRO, F. C.; ALMEIDA, E. A. Exposure to pesticides used in rice farming (bentazone, chlorantraniliprole and tebuconazole) affects biochemical biomarkers and hepatic histopathological parameters of hammetoad tadpoles (*Boana faber*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, p. 109960, 2024.

BOCEDI, A.; NOCE, A.; MARRONE, G.; NOCE, G.; CATTANI, G.; GAMBARDELLA, G.; DI LAURO, M.; DI DANIELE, N.; RICCI, G. Glutathione transferase P1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1741, 2019.

BOLIS, A.; GAZZOLA, A.; PELLITTERI-ROSA, D.; COLOMBO, A.; BONFANTI, P.; BELLATI, A. Exposure during embryonic development to Roundup® Power 2.0 affects lateralization, level of activity and growth, but not defensive behaviour of marsh frog tadpoles. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114395, 2020.

BONNEAUD, C.; MAZUC, J.; GONZALEZ, G.; HAUSSY, C.; CHASTEL, O.; FAIVRE, B.; SORCI, G. Assessing the cost of mounting an immune response. **The American Naturalist**, v. 161, n. 3, p. 367-379, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, B. A.; LAGINHAS, B. B.; WHITLOCK, R.; ALLEN, J. M.; BATES, A. E.; BERNATCHEZ, G.; DIEZ, J. M.; EARLY, R.; LENOIR, J.; VILÀ, M.; SORTE, C. J. B. Disentangling the abundance-impact relationship for invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 20, p. 9919-9924, 2019.

BUHLER, D. R.; WILLIAMS, D. E. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 11, n. 1-2, p. 19-28, 1988.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

BUCHHOLZ, D. R.; HAYES, T. B. Larval period comparison for the spadefoot toads *Scaphiopus couchii* and *Spea multiplicata* (Pelobatidae: Anura). **Herpetologica**, p. 455-468, 2000.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1985. p. 484-490.

CARNEIRO, F. E.; GROTT, S. C.; ISRAEL, N. G.; BITSCHINSKI, D.; ABEL, G.; ALVES, T. C.; DE ALBUQUERQUE, C. A. C.; DA SILVA, E. B.; ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on the biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) to 2-hydroxyatrazine exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 257, p. 106468, 2023.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CASHMAN, J. R.; PEROTTI, B. Y. T.; BERKMAN, C. E.; LIN, J. Pharmacokinetics and molecular detoxication. **Environmental health perspectives**, v. 104, n. suppl 1, p. 23-40, 1996.

CASTRO, T. F. D.; SOUZA, J. G. S.; DE CARVALHO, A. F. S.; ASSIS, I. L.; PALMIERI, M. J.; VIEIRA, L. F. A.; MARCUSSI, S.; MACHADO, M. R. F.; MURGAS, L. D. S. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 62, p. 140-146, 2018.

CAUBLE, K.; WAGNER, R. S. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 75, n. 3, p. 429-435, 2005.

CHAPMAN, P. M. Determining when contamination is pollution - weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 492-501, 2007.

COCCO, P. On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. **Cadernos de Saúde pública**, v. 18, p. 379-402, 2002.

COLLINS, J. P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 3, p. 93-99, 25 nov. 2010.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013. Brasília.

COSTA, R. N.; FRANCO, F.; SOLÉ, M.; ROSSA-FERES, D. C.; NOMURA, F. How Pollutants are Affecting Amphibian Tadpoles: Relationship with Anthropogenic Pollutants and Perspectives for the Future. In: ALMEIDA, Eduardo Alves de; FREITAS, Juliane Silberschmidt (ed.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2023. p. 1-26.

CURTIS, A. N.; BIDART, M. G. Increased temperature influenced growth and development of *Lithobates pipiens* tadpoles exposed to leachates of the invasive plant European buckthorn (*Rhamnus cathartica*) and a triclopyr herbicide. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 2547-2558, 2021.

CUZZIOL BOCCIONI, A. P.; PELTZERA, P. M.; MARTINUZZI, C. S.; ATTADEMO, A. M.; LEÓN, E. J.; LAJMANOVICH, R. C. Morphological and histological abnormalities of the neotropical toad, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) larvae exposed to dexamethasone. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 1, p. 41-53, 2020.

DAVID, M.; MARIGOUDAR, S. R.; PATIL, V. K.; 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**, v. 103, n. 2, p. 127-134, 2012.

DE GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Leukocyte profile of tadpoles and juveniles of *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (Anura) and the effects of nonylphenol and cyproterone acetate. **South American Journal of Herpetology**, v. 20, n. 1, p. 75-83, 2021.

DIETZ, T.; SHWOM, R. L.; WHITLEY, C. T. Climate change and society. **Annual Review of Sociology**, v. 46, n. 1, p. 135-158, 2020.

DOS SANTOS, G.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, V. J.; MÜLLER, C.; POMPERMAIER, A.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. 2, 4-D-based herbicide underdoses cause mortality, malformations, and nuclear abnormalities in *Physalaemus cuvieri* tadpoles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 277, p. 109840, 2024.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. **Chemico-biological interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 10-22, 2010.

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, n. 1-3, p. 27-33, 2001.

EJILIBE, C. O.; NWAMBA, H. O.; ANI, C. L.; MADU, J.; ONYISHI, G. C.; NWANI, C. D. Oxidative stress responses in *Bufo regularis* tadpole exposed to Butaforce® and Termex®. **J Fisheries Livest Prod**, v. 6, n. 270, p. 2, 2018.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Arroz**. 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/estatistica-de-producao>. Acesso em: 02 jun. 2025.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Arroz irrigado na região tropical**. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/producao/sistema-de-cultivo/arroz-irrigado-na-regiao-tropical>. Acesso em: 22 ago. 2025.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Restricted Use Products (RUP) Report**. 2024. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-worker-safety/restricted-use-products-rup-report>. Acesso em: 08 nov. 2024.

ETEROVICK, P. C.; LAZAROTTI, I.; FRANCO, B. P.; DIAS, C. J. Seasonal variation of tadpole spatial niches in permanent streams: the roles of predation risk and microhabitat availability. **Austral Ecology**, v. 35, n. 8, p. 879-887, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. **Active substances, safeners and synergists (1481 matching records)**. 2024. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>. Acesso em: 08 nov. 2024

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and agriculture data**. 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FREITAS, J. S.; ALMEIDA, E. A. Antioxidant defense system of tadpoles (*Eupemphix nattereri*) exposed to changes in temperature and pH. **Zoological science**, v. 33, n. 2, p. 186-194, 2016.

FREITAS, J. S.; KUPSCO, A.; DIAMANTE, G.; FELICIO, A. A.; ALMEIDA, E. A.; SCHLENK, D. Influence of temperature on the thyroidogenic effects of Diuron and its metabolite 3, 4-DCA in tadpoles of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 23, p. 13095-13104, 2016.

FREITAS, J. S. Pollutants and Oxidative Stress in Tadpoles. In: ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. (ed.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2023. p. 111-132.

FREITAS, J. S.; TERESA, F. B.; ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 197, p. 32-44, 2017.

FROST, D. **Amphibian Species of the World 6.2, an Online Reference**. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Acesso em: 16 jul. 2025.

GEORGE-GAY, B.; PARKER, K. Understanding the complete blood count with differential. **Journal of PeriAnesthesia Nursing**, v. 18, n. 2, p. 96-117, 2003.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 400, 1953.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960.

GROTT, S. C.; BITSCHINSKI, D. ISRAEL, N. G.; ABEL, G.; SILVA, S. P.; ALVES, T. C.; LIMA, D.; BAINY, A. C. D.; MATTOS, J. J.; SILVA, E. B.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on biomarker responses and histology of the liver of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*,

Shaw, 1802) exposed to the herbicide Tebuthiuron. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144971, 2021.

GROTT, S. C.; ISRAEL, N.; LIMA, D.; BITSCHINSKI, D.; ABEL, G.; ALVES, T. C.; DA SILVA, E. B.; DE ALBUQUERQUE, C. A. C.; MATTOS, J. J.; BAINY, A. C. D.; ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on growth, development and thyroid metabolism of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide tebuthiuron. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 103910, 2022. (a)

GROTT, S. C.; ISRAEL, N. G.; BITSCHINSKI, D.; ABEL, G.; CARNEIRO, F.; ALVES, T. C.; ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide ametryn. **Chemosphere**, v. 308, p. 136327, 2022. (b)

HALLMAN, T. A.; BROOKS, M. L. The deal with diel: temperature fluctuations, asymmetrical warming, and ubiquitous metals contaminants. **Environmental pollution**, v. 206, p. 88-94, 2015.

HARTEL, T.; VON WEHRDEN, H. Farmed areas predict the distribution of amphibian ponds in a traditional rural landscape. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 63649, 2013.

HAYES, T. B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V. P.; MARJUOA, Y.; PARKER, J.; TSUI, M. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 1, p. 40-50, 2006.

HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010.

HEDLUND, J.; LONGO, S. B.; YORK, R. Agriculture, pesticide use, and economic development: a global examination (1990–2014). **Rural sociology**, v. 85, n. 2, p. 519-544, 2020.

HIGLEY, E.; TOMPSETTA, A. R.; GIESYA, J. P.; HECKERA, M.; WISEMAN, S. Effects of triphenyltin on growth and development of the wood frog (*Lithobates sylvaticus*). **Aquatic toxicology**, v. 144, p. 155-161, 2013.

HOOPER, D. U.; ADAIR, E. C.; CARDINALE, B. J.; BYRNES, J. E. K.; HUNGATE, B. A.; MATULICH, K. L.; GONZALEZ, A.; DUFFY, J. E.; GAMFELDT, L.; O'CONNOR, M. I. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 105-108, 2012.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996. Brasília, 2022.

INAGAKI, S. The relationship between the level of circulating basophil leucocytes and thyroid function. **European Journal of Endocrinology**, v. 26, n. 4, p. 477-488, 1957.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Agrotóxico**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso em: 02 jun. 2025.

IOP, S.; SANTOS, T. G.; CECHIN, S. Z. **Anfíbios anuros dos Campos Sulinos: espécies com ocorrência nas áreas campestres do pampa e da mata atlântica.** Porto Alegre: Rede Campos Sulinos - UFRGS, 2016

ISLAM, S. M. M.; ZAHANGIR, M. D. M.; ASHAF-UD-DOULAH, M.; KHATUN, M. T. M.; SHAHJAHAN, M. D. Extreme warm acclimation temperature alters oxygen consumption, micronucleus formation in erythrocytes, and gill morphology of rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 2323-2330, 2020.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Animals.** 2024. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 04 nov. 2024.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species 2023: *Boana faber*.** 2023. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/55479/101425283>. Acesso em: 01 nov. 2024.

JING, X.; YAO, G.; LIU, D.; LIU, C.; WANG, F.; WANG, P.; ZHOU, Z. Exposure of frogs and tadpoles to chiral herbicide fenoxaprop-ethyl. **Chemosphere**, v. 186, p. 832-838, 2017.

JOHNSON, C. S.; SCHWARZBACH, S. E.; HENDERSON, J. D.; WILSON, B. W.; TJEERDEMA, R. S. Influence of water temperature on acetylcholinesterase activity in the Pacific tree frog (*Hyla regilla*). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 24, n. 8, p. 2074-2077, 2005.

JUHLIN, L. Basophil and eosinophil leukocytes in various internal disorders. **Acta Medica Scandinavica**, v. 174, n. 2, p. 249-255, 1963.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; ATTADAMO, A. M.; JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 769, p. 7-12, 2014.

LAURILA, A.; PAKKASMAA, S.; MERILÄ, J. Influence of seasonal time constraints on growth and development of common frog tadpoles: a photoperiod experiment. **Oikos**, v. 95, n. 3, p. 451-460, 2001.

LAVORATO, M.; BERNABÒ, I.; CRESCENTE, A.; DENOËL, M.; TRIPEPI, S.; BRUNELLI, E. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 64, n. 2, p. 253-262, 2013.

LEITE, P. Z.; MARGARIDO, T. C. S.; DE LIMA, D.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 1411-1421, 2010.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.; AHN, B.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 464-478, 1990.

LIMA, D. **Influência da temperatura e do ph em respostas bioquímicas e moleculares de ostras *Crassostrea brasiliiana* expostas a fenantreno**. 2017. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LOPES, A. T. C.; BENVINDO-SOUZA, M.; SOTERO, D. F.; PEDROSO, T. M. A.; TOMAZ, A. A.; COSTA, A. G.; GOIS, A. R. S.; VIEIRA, T. B.; BASTOS, R. P.; E SILVA, D. M. Sublethal Effects of Atrazine Concentrations Exposure on Tadpoles of *Dendropsophus minutus*: Evaluation of Redox Status, Micronuclei Frequencies and Comet Assay as Biomarkers. **Aquatic Toxicology**, p. 107260, 2025.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

LUSHCHAK, V. I.; SEMCHYSHYN, H. M.; LUSHCHAK, O. V. The classic methods to measure oxidative damage: lipid peroxides, thiobarbituric-acid reactive substances, and protein carbonyls. **Oxidative stress in aquatic ecosystems**, p. 420-431, 2012.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, V. J.; MÜLLER, C.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. Mortality and toxicity of a commercial formulation of cypermethrin in *Physalaemus gracilis* tadpoles. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 17826, 2023.

MACIEL, T. A.; JUNCÁ, F. A. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura). **Zoologia (curitiba)**, v. 26, p. 413-418, 2009.

MANIERO, G. D.; CAREY, C. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 167, n. 4, p. 256-263, 1997.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

MAS-BARGUES, C.; ESCRIVA, C.; DROMANT, M.; BORRAS, C.; VINÃ, J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 709, p. 108941, 2021.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MIDDLEBROOKS, E. J., GASPAR, M. J., GASPAR, R. D., REYNOLDS, J. H. Effects of Temperature on the Toxicity to the Aquatic Biota of Waste Discharges - A Compilation of the Literature. **Reports**, 1973.

MIKÓ, Z.; UJSZEGI, J.; HETTYEY, A. Age-dependent changes in sensitivity to a pesticide in tadpoles of the common toad (*Bufo bufo*). **Aquatic Toxicology**, v. 187, p. 48-54, 2017.

MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 6, p. 2265-2303, 2011.

MONTEIRO, J. A. N.; DA CUNHA, L. A.; DA COSTA, M. H. P.; DOS REIS, H. S.; AGUIAR, A. C. S.; DE OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; C; BURBANO, R. M. R. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 163, p. 400-407, 2018.

MOON, P. **Desmatamento favorece ação de fungo que dizima anfíbios**. 2018. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/desmatamento-favorece-acao-de-fungo-que-dizima-anfibios/27369>. Acesso em: 01 nov. 2024.

MURPHY, M. P.; BAYIR, H.; BELOUSOV, V.; CHANG, C. J.; DAVIES, K. J. A.; DAVIES, M. J.; DICK, T. P.; FINKEL, T.; FORMAN, H. J.; JANSSEN-HEININGER, Y.; GEMS, D.; KAGAN, V. E.; KALYANARAMAN, B.; LARSSON, N.; MILNE, G. L.; NYSTRÖM, T.; POULSEN, H. E.; RADI, R.; REMMEN, H. V.; SCHUMACKER, P. T.; THORNALLEY, P. J.; TOYOKUNI, S.; WINTERBOURN, C. C.; YIN, H.; HALLIWELL, B. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. **Nature Metabolism**, v. 4, n. 6, p. 651-662, 27 jun. 2022.

National Academy of Sciences. **Advancing the science of climate change**. Washington: The National Academies Press, 2010.

NAVARRO-MARTÍN, L.; LANCTÔTA, C.; P. JACKMANB, P.; PARKC, B. J.; DOEB, K.; PAULID, B. D.; TRUDEAUA, V. L. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: chronic laboratory exposures to VisionMax®. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 278-290, 2014.

NDLOVU, R.; BASOPO, N. Pesticide-induced alterations of esterase and antioxidant enzymes of aquatic organisms *Oreochromis mossambicus* and *Xenopus laevis*. **Advances in Biological Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 292-305, 2022.

NEWMAN, M. C. **Fundamentals of Ecotoxicology**: the science of pollution. Boca Raton: CRC Press, 2015.

NIH. National Library of Medicine. **Azoxystrobin**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3034285>. Acesso em: 06 nov. 2024.

NIH. National Library of Medicine. **Bentazone**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2328>. Acesso em: 06 nov. 2024.

NIH. National Library of Medicine. **Chlorantraniliprole**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11271640>. Acesso em: 06 nov. 2024.

- NIH. National Library of Medicine. **Cypermethrin**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2912>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- NIH. National Library of Medicine. **Fenoxaprop-P-ethyl**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91707>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- NIH. National Library of Medicine. **Imazapic**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91770>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- NIH. National Library of Medicine. **Penoxsulam**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11784975>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- NIH. National Library of Medicine. **Quinclorac**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91739>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- NIH. National Library of Medicine. **Tebuconazole**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86102>. Acesso em: 06 nov. 2024.
- NIU, Z.; PU, P.; ZHANG, T.; JIA, L.; LI, X.; WANG, H.; MA, M.; TANG, X.; CHEN, Q. Effects of warming at embryonic and larval stages on tadpole fitness in high-altitude *Rana kukunoris*. **Journal of Thermal Biology**, v. 123, p. 103895, 2024.
- NOYES, P. D.; LEMA, S. C. Forecasting the impacts of chemical pollution and climate change interactions on the health of wildlife. **Current Zoology**, v. 61, n. 4, p. 669-689, 2015.
- NUNES, A.; SCHMITZ C.; MOURA, S.; MARASCHIN, M. The use of pesticides in Brazil and the risks linked to human health. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37885-37904, 2021.
- OHMER, M. E. B.; HAMMOND, T. T.; SWITZER, S.; WANTMAN, T.; BEDNARK, J. G.; PACIOTTA, E.; COSCIA, J.; RICHARDS-ZAWACKI, C. L. Developmental environment has lasting effects on amphibian post-metamorphic behavior and thermal physiology. **Journal of Experimental Biology**, v. 226, n. 9, p. jeb244883, 2023.
- OLIVEIRA, C. R.; GARCIA, T. D.; FRANCO-BELUSSI, L.; SALLA, R. F.; SOUZA, B. F. S.; DE MELO, N. F. S.; IRAZUSTA, S. P.; JONES-COSTA, M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FRACETO, L. F. Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: Toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles. **Environmental Pollution**, v. 253, p. 1009-1020, 2019.
- ORR, J. A.; VINEBROOKE, R. D.; JACKSON, M. C.; KROEKER, K. J.; KORDAS, R. L.; MANTYKA-PRINGLE, C.; VAN DEN BRINK, P. J.; DE LAENDER, F.; STOKS, R.; HOLMSTRUP, M.; MATTHAEI, C. D.; MONK, W. A.; PENK, M. R.; LEUZINGER, S.; SCHÄFER, R. B.; PIGGOTT, J. J. Towards a unified study of multiple stressors: divisions and common goals across research disciplines. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1926, p. 1-10, 2020.
- PAMPLONA, R.; BORRAS, C.; JOVÉ, M.; PRADAS, I.; FERRER, I.; VIÑA, J. Redox lipidomics to better understand brain aging and function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 144, p. 310-321, 2019.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 112-117, 2005.

PELTZER, P. M.; BOCCIONI, A. P. C.; MAXIMILIANO, A. A.; CURI, L. M.; SANDOVAL, M. T.; BASSÓ, A.; MARTINUZZI, C. L.; LEÓN, E. J.; LAJMANOVICH, R. F.; LAJMANOVICH, R. C. Hierarchical Levels of Biomarkers in Amphibian Tadpoles Exposed to Contaminants: From Enzyme Disruptions to Etho-Toxicology Studies in Argentina. In: ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. (ed.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2023. p. 63-77.

ORTON, F.; TYLER, C. R. Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? **Biological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1100-1117, 2015.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; BRODEUR, J. C.; LARRAMENDY, M. L. An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 2131-2143, 2020.

POUNDS, A.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; CORN, S. Climate Change, Biodiversity Loss, and Amphibian Declines. In: GASCON, C.; COLLINS, J. P.; MOORE, R. D.; CHURCH, D. R.; MCKAY, J. E.; MENDELSON III, J. R. (ed.). **Amphibian Conservation Action Plan**. Gland: The World Conservation Union, p. 19-20, 2007.

PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19-31, 2012.

RAFFEL, T. R.; ROHR, R.; KIESECKER, J. M.; HUDSON, P. J. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. **Functional Ecology**, p. 819-828, 2006.

RAY, A.; DUTTA, D.; GHOSH, B.; BAHADUR, M. Azoxystrobin induced genotoxicity in *Pethia conchonius*, a freshwater fish of river Teesta, India. **Aquatic Toxicology**, v. 277, p. 107135, 2024.

REICHERT, L. M. M.; OLIVEIRA, D. R.; PAPALEO, J. L.; VALGAS, A. A. N.; OLIVEIRA, G. T. Impact of commercial formulations of herbicides alone and in mixtures on the antioxidant system and body condition parameters in tadpoles of *Rhinella icterica* (Spix 1824). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 100, p. 104145, 2023.

REICHERT, L. M. M.; VALGAS A. A. N.; DE OLIVEIRA D. R.; PAPALEO, J. L.; OLIVEIRA, G. T. Biochemical and body condition markers in *Rhinella icterica* tadpoles exposed to atrazine, glyphosate, and quinclorac based herbicides in ecologically relevant concentrations. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 93, p. 103884, 2022.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

ROBERT, J.; OHTA, Y. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 6, p. 1249-1270, 2009.

ROBINSON, S. A.; CHLEBAK, R. J.; YOUNG, S. D.; DALTON, R. L.; GAVEL, M. J.; PROSSER, R. S.; BARTLETT, A. J.; DE SOLLA, S. R. Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. **Environmental pollution**, v. 284, p. 117149, 2021.

ROLLINS-SMITH, L. A.; LE SAGE, E. H. Heat stress and amphibian immunity in a time of climate change. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 378, n. 1882, p. 20220132, 2023.

ROSS, M. K.; CROW, J. A. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 21, n. 4, p. 187-196, 2007.

RUTKOSKI, C. F.; ALMEIDA, E. A. Pollutant Effects on Immune Defense Cells of Anuran Tadpoles. In: ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. (ed.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2023. p. 152-161.

RUTKOSKI, C. F.; GROTT, S. C.; ISRAEL, N. G.; CARNEIRO, F. E.; GUERREIRO, F. C.; SANTOS, S.; HORN, P. A.; TRENTINI, A. A.; SILVA, E. B.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; ALVES, T. C.; ALMEIDA, E. A. Hepatic and blood alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to sulfamethoxazole and oxytetracycline. **Chemosphere**, v. 307, p. 136215, 2022.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, V. J.; DO AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J. W.; COSTA, M. D.; HARTMANN, P. A.; MÜLLER, C.; LORO, V. L.; HARTMANN, M. T. Cypermethrin- and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 4377-4387, 2020.

RYMUSZKA, A.; ADASZEK, Ł. Cytotoxic effects and changes in cytokine gene expression induced by microcystin-containing extract in fish immune cells – An in vitro and in vivo study. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1524-1532, 2013.

SANTOS, R. C. **Influência de fatores ambientais sobre a composição, diversidade funcional e doenças infecciosas em comunidades de girinos no Sul do Brasil**. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2022.

SCHEELE, B. C.; PASMANS, F.; SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; MARTEL, A.; BEUKEMA, W.; ACEVEDO, A. A.; BURROWES, P. A.; CARVALHO, T.; CATENAZZI, A.; DE LA RIVA, I.; FISHER, M. C.; FLECHAS, S. V.; FOSTER, C. N.; FRÍAS-ÁLVAREZ, P.; GARNER, T. W. J.; GRATWICKE, B.; GUAYASAMIN, J. M.; HIRSCHFELD, M.; KOLBY, J. E.; KOSCH, T. A.; LA MARCA, E.; LINDENMAYER, D. B.; LIPS, K. R.; LONGO, A. V.; MANEYRO, R.; MCDONALD, C. A.; MENDELSON III, J.; PALACIOS-RODRIGUEZ, P.; PARRA-OLEA, G.;

RICHARDS-ZAWACKI, C. L.; RÖDEL, M.; ROVITO, S. M.; SOTO-AZAT, C.; TOLEDO, L. F.; VOYLES, J.; WELDON, C.; WHITFIELD, S. M.; WILKINSON, M.; ZAMUDIO, K. R.; CANESSA, S. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459-1463, 2019.

SEGALLA, M. V.; BERNECK, B.; CANEDO, C.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARCIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LOURENÇO, A. C. C.; MÂNGIA, S.; MOTT, T.; NASCIMENTO, L. B.; TOLEDO, L. F.; WERNECK, F. P.; LANGONE, J. A. List of Brazilian amphibians. **Herpetologia brasileira**, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.

SHAHJAHAN, M.; KHATUN, M. S.; MUN, M. M.; ISLAM, S. M. M.; UDDIN, M. H.; BADRUZZAMAN, M.; KHAN, S. Nuclear and cellular abnormalities of erythrocytes in response to thermal stress in common carp *Cyprinus carpio*. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 543, 2020.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SILVA, D. M.; VIEIRA, T. Q.; SOUZA, M. B.; BATISTA, F. R. Q.; NUNES, H. F.; MORAIS, A. R.; ALMEIDA, E. A. Genotoxicity and Mutagenicity in Anuran Amphibians. In: ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. (ed.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2023. p. 133-151.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. D.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões rizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2383-2389, 2009.

SILVA, M. B.; FRAGA, R. E.; NISHIYAMA, P. B.; DA SILVA, I. S. S.; COSTA, N. L. B.; DE OLIVEIRA, L. A. A.; ROCHA, M. A.; JUNCÁ, F. A. Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 7, p. 372, 2020.

SILVA, P. R. **Influência do herbicida Quinclorac sobre os níveis de lipoperoxidação e das defesas antioxidantes enzimáticas no tecido muscular de *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae)**. 2014. 49 f. TCC (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SLAVIERO, J. G. **Efeitos da toxicidade crônica do inseticida cipermetrina em girinos de *Physalaemus gracilis* (Amphibia, Anura)**. 2017. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

SOARES, W. L.; CUNHA, L. N.; PORTO, M. F. S. **Uma política de incentivo fiscal a agrotóxicos no Brasil é injustificável e insustentável**. Rio de Janeiro: Abrasco, 2020.

SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas de pesquisa para o Sul do Brasil**. 2022.

STORZ, G.; IMLAYT, J. A. Oxidative stress. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 2, p. 188-194, 1999.

SUGIYAMA, S.; SHIMADA, N.; MIYOSHI, H.; YAMAUCHI, K. Detection of thyroid system–disrupting chemicals using in vitro and in vivo screening assays in *Xenopus laevis*. **Toxicological sciences**, v. 88, n. 2, p. 367-374, 2005.

SYNGENTA. **AMISTAR WG**. 2024. Disponível em: <https://www.syngenta.com.br/product/crop-protection/fungicida/amistar-wg>. Acesso em: 06 nov. 2024.

TANG, X.; XI, L.; NIU, Z.; JIA, L.; BAI, Y.; WANG, H.; MA, M.; CHEN, Q. Does a Moderately Warming Climate Compensate for the Negative Effects of UV-B Radiation on Amphibians at High Altitudes? A Test of *Rana kukunoris* Living on the Qinghai–Tibetan Plateau. **Biology**, v. 11, n. 6, p. 838, 2022.

TAVARES-JUNIOR, C.; ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; PIRES, M. R. S. Environmental drivers of tadpole community structure in temporary and permanent ponds. **Limnologia**, v. 81, p. 125764, 2020.

THAMBIRAJAH, A. A.; KOIDE, E. M.; IMBERY, J. J.; HELBING, C. C. Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 276, 2019.

THONNARD-NEUMANN, E. The influence of hormones on the basophilic leukocytes. **Acta Haematologica**, v. 25, n. 4, p. 261-270, 1961.

TIMBRELL, J. A. **Principles of biochemical toxicology**. CRC press, 2008.

VERHEYEN, J.; DELNAT, V.; THEYS, C. Daily temperature fluctuations can magnify the toxicity of pesticides. **Current Opinion in Insect Science**, v. 51, p. 100919, 2022.

WAKE, D. B.; KOO, M. S. Amphibians. **Current Biology**, v. 28, n. 21, p. 1237-1241, 2018.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2012.

WARSNESKI, A.; BITSCHINSKI, D.; RUTKOSKI, C. F.; ISRAEL, N. G.; GONÇALVES, G. H. P.; LÃ, L.; GUERREIRO, F.; GIASSON, L. O. M.; DE ALBUQUERQUE, C. A. C.; HASCKEL, R. P.; DA SILVA, E. B.; ALVES, T. C.; ALMEIDA, E. A. Fungicides from rice cultivation (tebuconazole and azoxystrobin) alters biochemical and histological markers of hammertoad tadpoles (*Boana faber*). **Environmental Pollution**, v. 341, p. 122900, 2024.

WEERATHUNGA, W. A. M. T.; RAJAPAKSA, G. The impact of elevated temperature and CO₂ on growth, physiological and immune responses of *Polypedates cruciger* (common hourglass tree frog). **Frontiers in Zoology**, v. 17, p. 1-25, 2020.

WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1981. p. 325-333.

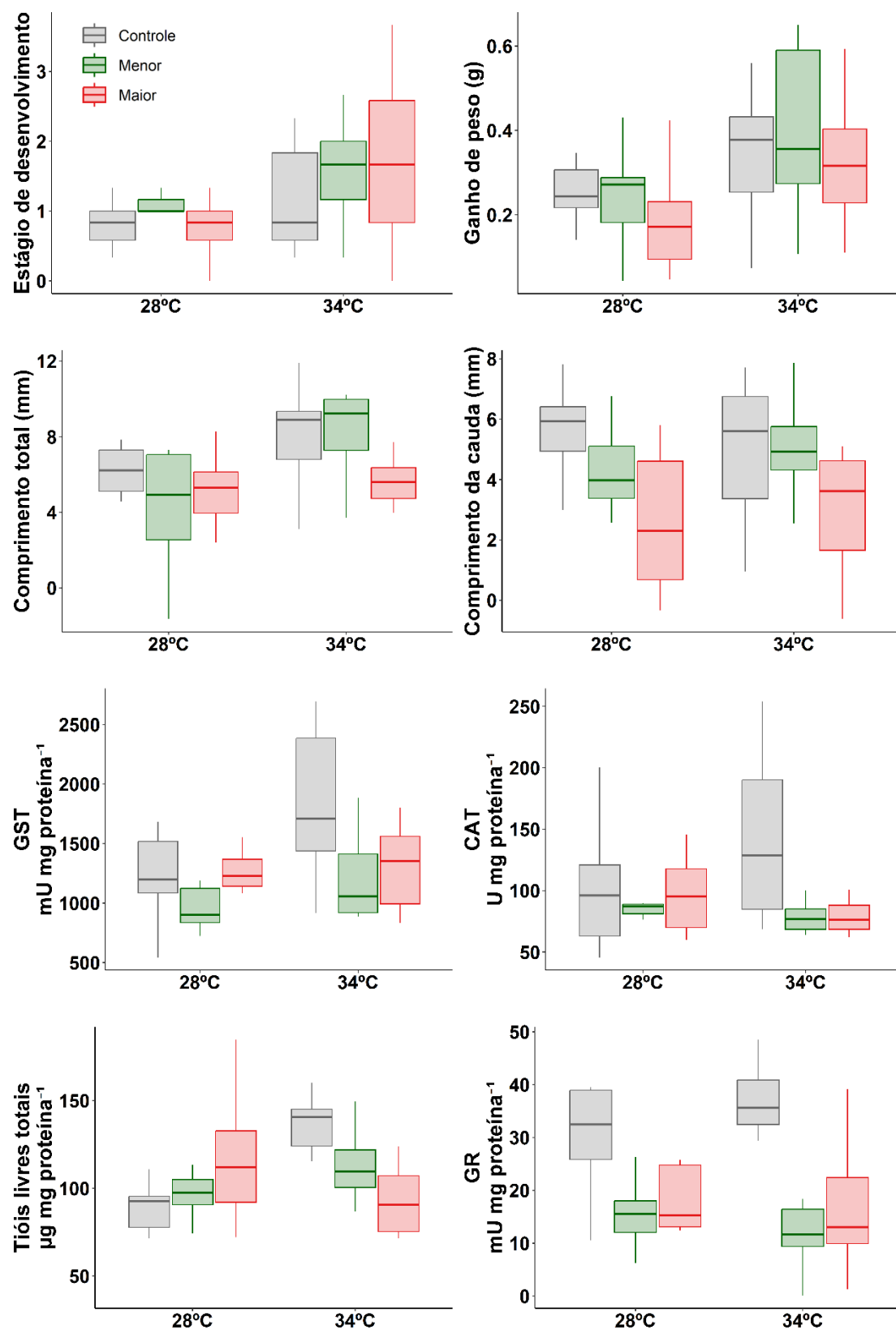
WHITMARSH, L.; POORTINGA, W.; CAPSTICK, S. Behaviour change to address climate change. **Current opinion in psychology**, v. 42, p. 76-81, 2021.

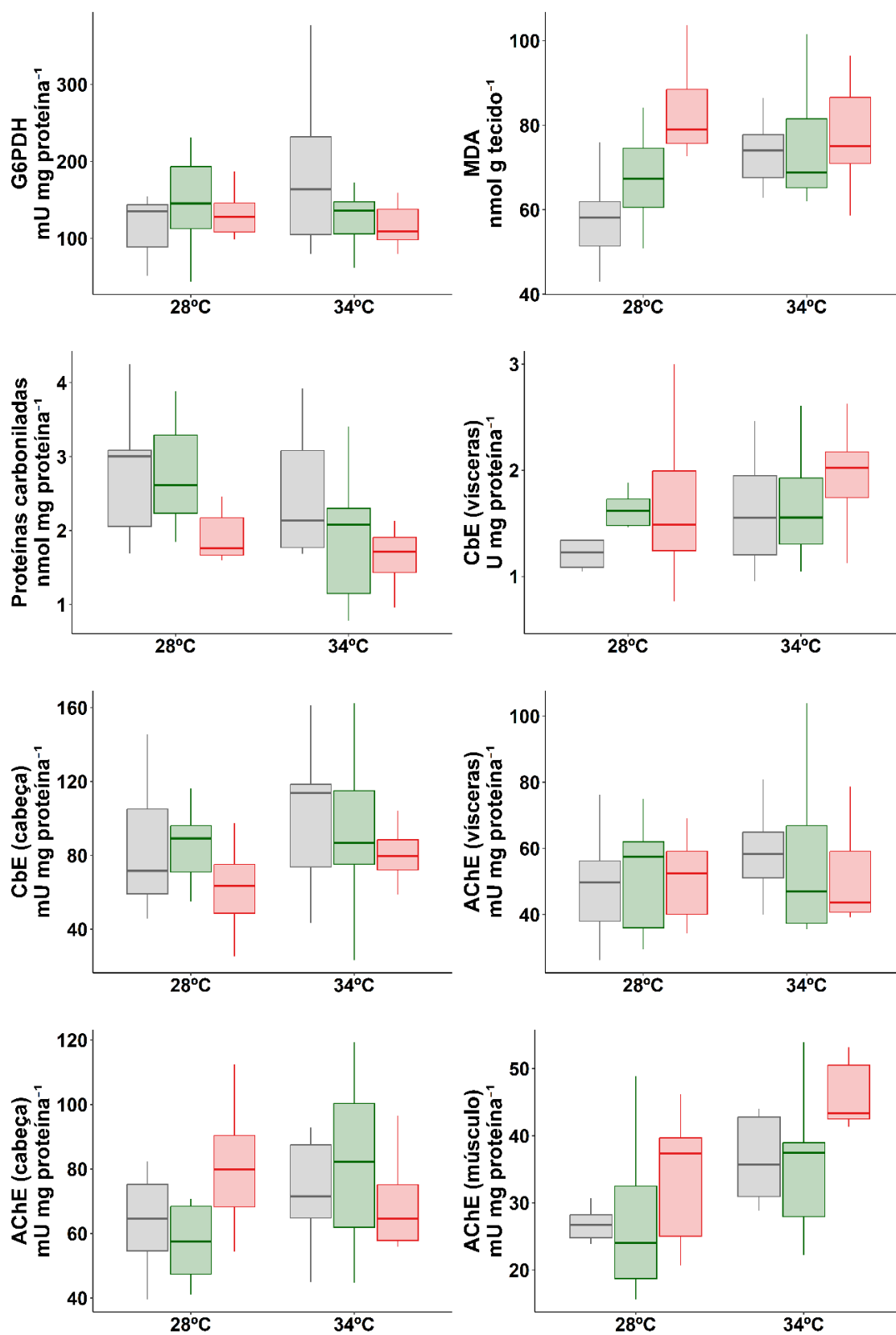
YE, X.; ZHANG, C.; CHEN, Y.; ZHOU, T. Upregulation of acetylcholinesterase mediated by p53 contributes to cisplatin-induced apoptosis in human breast cancer cell. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 48, 2015.

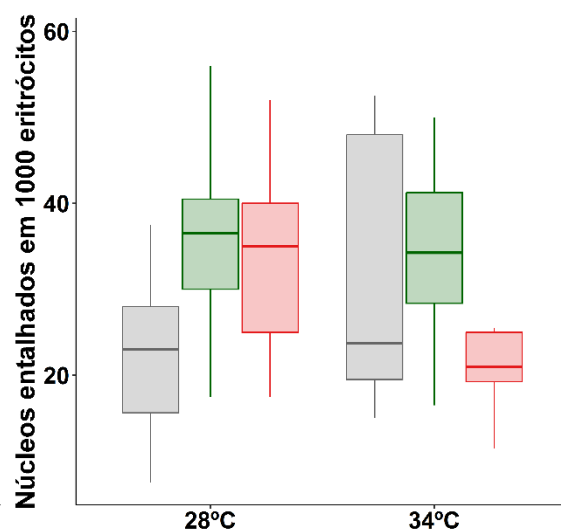
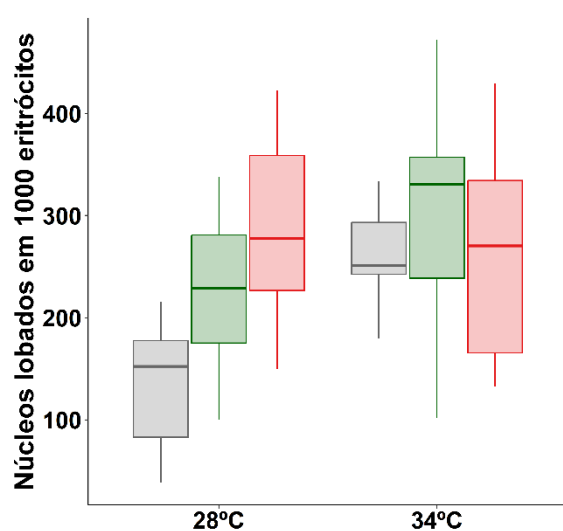
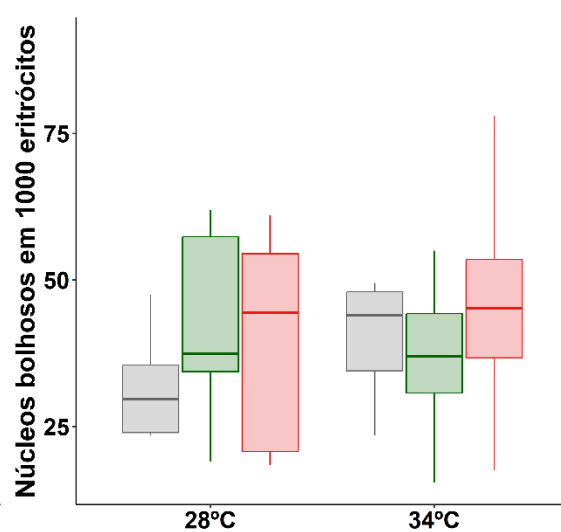
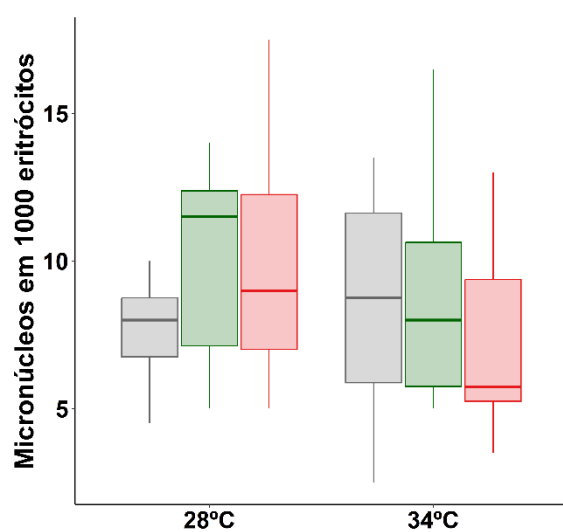
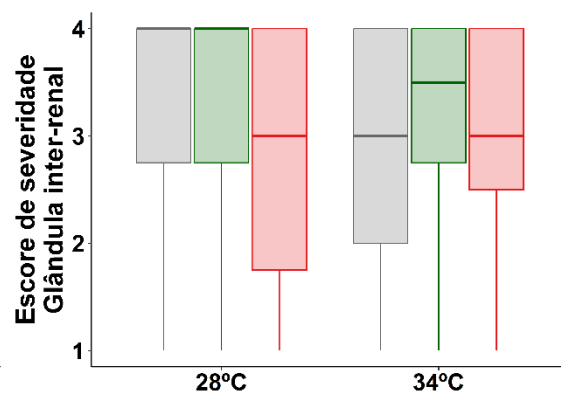
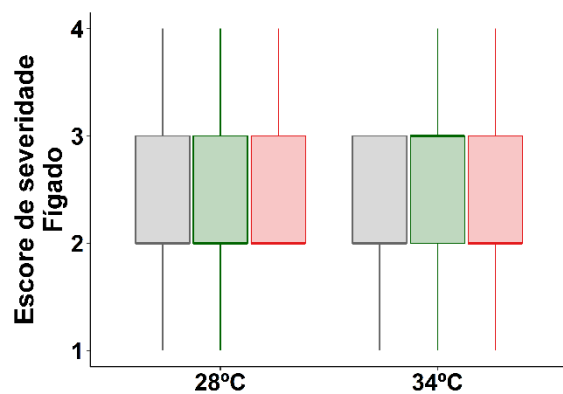
YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.

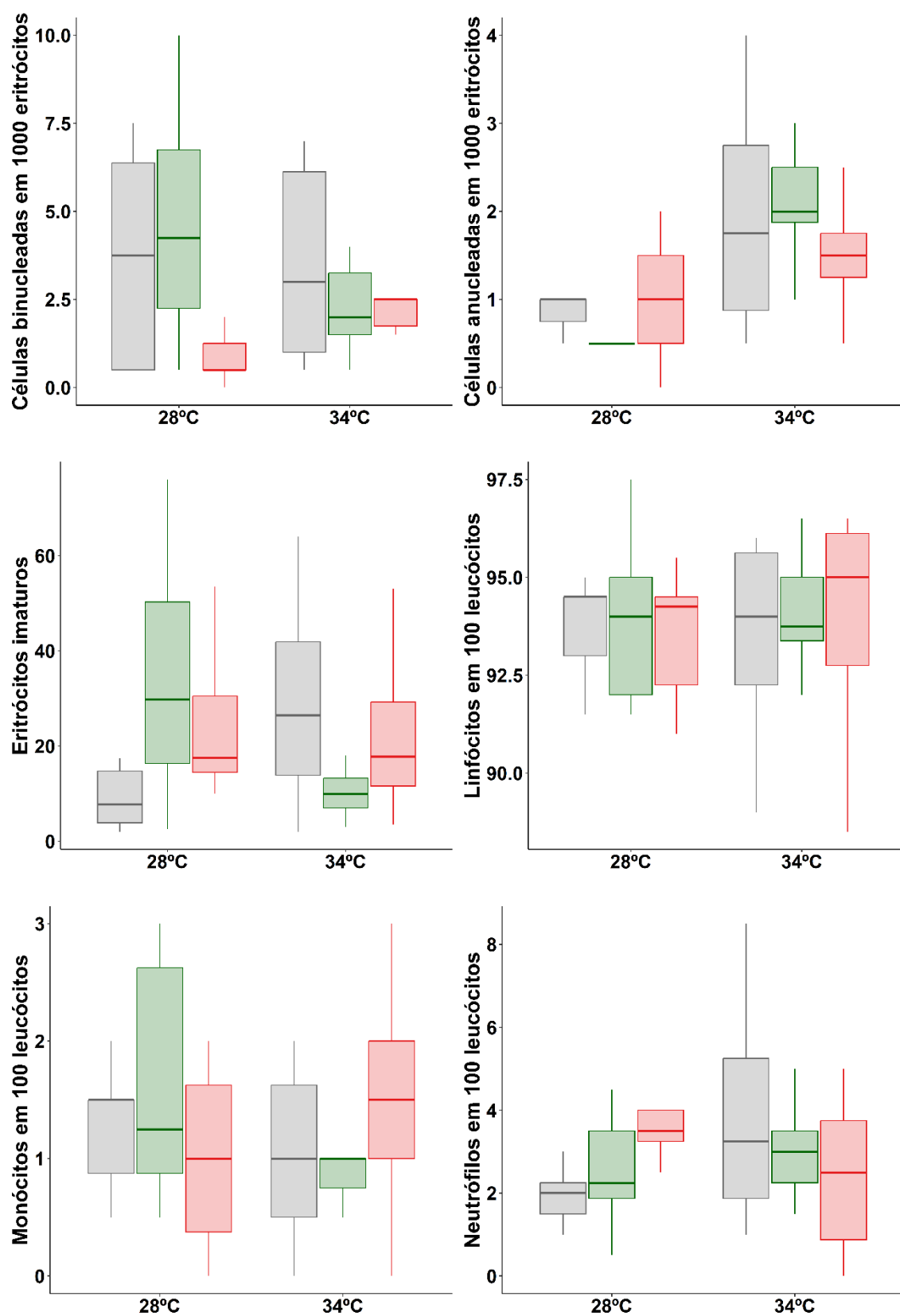
YOLOGLU, E.; OZMEN, M. Low concentrations of metal mixture exposures have adverse effects on selected biomarkers of *Xenopus laevis* tadpoles. **Aquatic toxicology**, v. 168, p. 19-27, 2015.

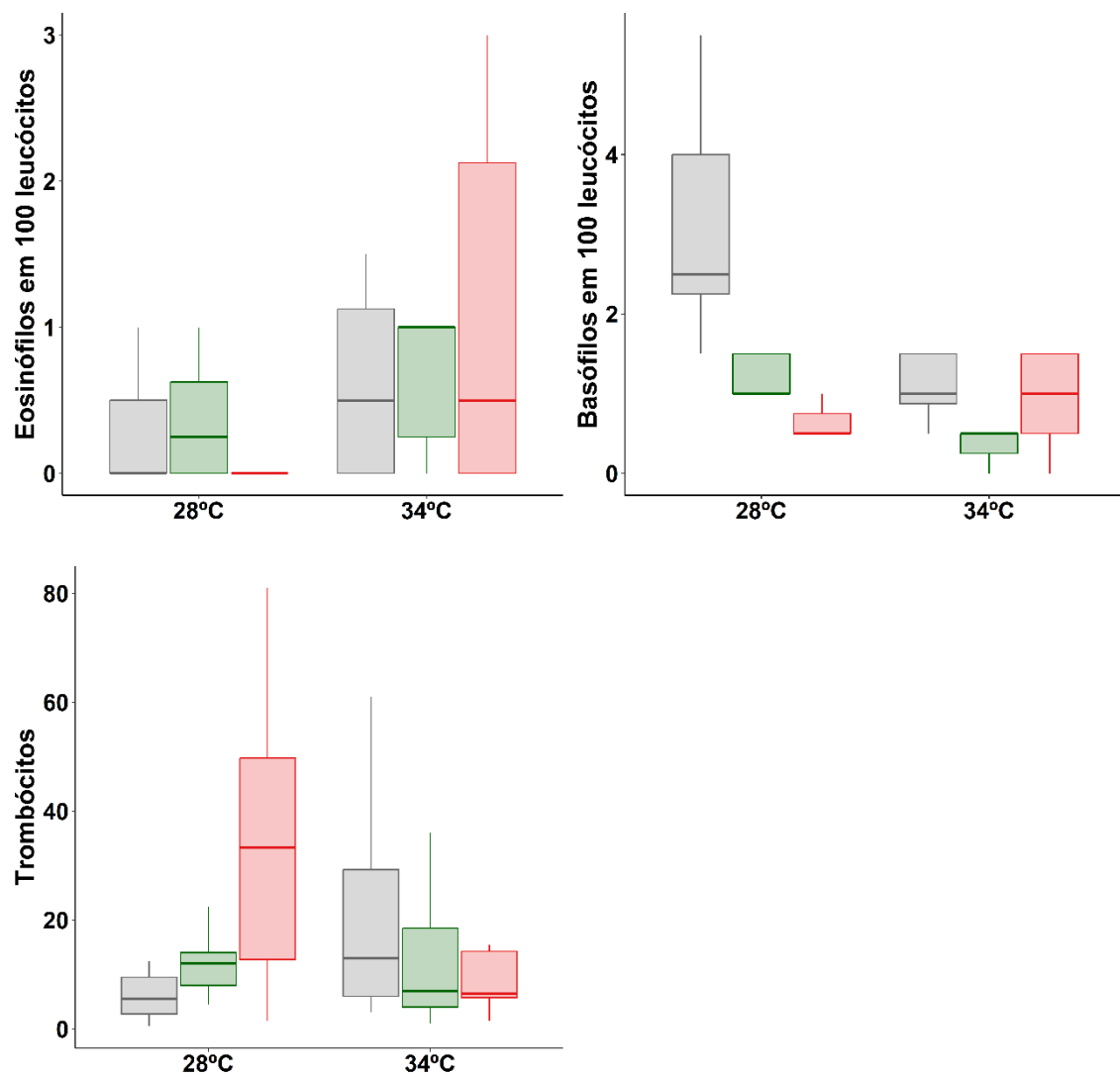
ZHANG, X. J.; YANG, L.; ZHAO, Q.; CAEN, J. P.; HE, H. Y.; JIN, Q. H.; GUO, L. H.; ALEMANY, M.; ZHANG, L. Y.; SHI, Y. F. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 8, p. 790-800, 2002.

APÊNDICE A – Gráficos das análises sem efeito significativo de interação









ANEXO A – Autorização do SISBIO para a coleta dos girinos



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91718-1	Data da Emissão: 28/12/2023 11:29:22	Data da Revalidação: 28/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Beatriz Pellis	CPF: 089.545.449-16
Título do Projeto: Influência da temperatura nos efeitos causados por agrotóxicos de rizicultura em girinos de sapo-martelo (Boana faber)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta das amostras biológicas	02/2024	02/2024
2	Escrita de relatório	08/2024	10/2024
3	Aclimação dos girinos no laboratório	02/2024	02/2024
4	Coleta dos girinos	01/2024	02/2024
5	Experimento de exposição	02/2024	02/2024
6	Análise das amostras biológicas	03/2024	02/2025
7	Qualificação do mestrado	07/2024	07/2024
8	Defesa do mestrado	07/2025	07/2025

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	LUÍS OLÍMPIO MENTA GIASSON	Pesquisador	919.144.000-97	Brasileira
2	Eduardo Alves de Almeida	Pesquisador	003.916.319-93	Brasileira
3	Gustavo Henrique Pereira Gonçalves	Coletador	055.286.269-00	Brasileira
4	ALINE WARSNESKI	Coletador	073.095.599-08	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Todos os membros da equipe de pesquisa devem estar cientes das recomendações e boas práticas a serem seguidas neste momento de emergência zoonosária no Brasil devido à gripe aviária. Informe-se na página do CEMAVE na Internet: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cehave/destaques/gripe-aviaria/gripe-aviaria-1 .
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Este documento não dispensa o cumprimento da Lei nº 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia (Decreto nº 98.830, de 15/01/90).
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena, da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0917180120231228

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91718-1	Data da Emissão: 28/12/2023 11:29:22	Data da Revalidação*: 28/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Beatriz Pellis	CPF: 089.545.449-16
Título do Projeto: Influência da temperatura nos efeitos causados por agrotóxicos de rizicultura em girinos de sapo-martelo (Boana faber)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Observações e ressalvas

7	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Portaria Nº748/2022, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
8	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
9	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação do disposto nesta portaria ou em legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, pode, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou cassada pelo Instituto Chico Mendes, por meio da Coordenação Gestora do Sisbio, e está sujeito às sanções previstas na legislação vigente.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	Caso seja identificada a ocorrência de espécie exótica dentro ou no entorno de UNIDADE DE CONSERVAÇÃO FEDERAL, além de descrever no relatório de atividades, o pesquisador deve informar à equipe gestora com maior brevidade possível.

Outras ressalvas

1	Esta Autorização SISBIO não exige o (a) pesquisador (a) de apresentar este projeto para o comitê de ética (CEUA) de sua instituição ou de instituição parceira e só deverá iniciar os trabalhos após aprovação do mesmo pelo comitê.	RAN Goiânia-GO
---	--	----------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Cachoeira Formosa	Rio dos Cedros-SC	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Atividades ex-situ (fora da natureza)
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0917180120231228

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91718-1	Data da Emissão: 28/12/2023 11:29:22	Data da Revalidação*: 28/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Beatriz Pellis	CPF: 089.545.449-16
Título do Projeto: Influência da temperatura nos efeitos causados por agrotóxicos de rizicultura em girinos de sapo-martelo (Boana faber)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Boana faber	200
2	Captura de animais silvestres in situ	Boana faber	-
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Boana faber	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Puçã

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0917180120231228

Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91718-1	Data da Emissão: 28/12/2023 11:29:22	Data da Revalidação*: 28/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICBM nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Beatriz Pellis	CPF: 089.545.449-16
Título do Projeto: Influência da temperatura nos efeitos causados por agrotóxicos de rizicultura em girinos de sapo-martelo (Boana faber)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina	CNPJ: 83.899.526/0001-82

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com Portaria ICMBIO Nº 748, Art. 24. A coleta imprevista de amostras biológicas, espécimes ou de material abiótico em unidades de conservação e cavernas, não contemplados na autorização ou na licença permanente, deve ser imediatamente anotada em campo específico do documento.

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0917180120231228

Página 4/4

ANEXO B - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (FURB)


www.furb.br

UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU

Certificado CEUA

Certificamos que o projeto intitulado “**Influência da temperatura nos efeitos causados por agrotóxicos de rizicultura em girinos de sapo-martelo (*Boana faber*)**”, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Eduardo Alves de Almeida, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o ser humano), para fins de pesquisa científica, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) na Universidade Regional de Blumenau (FURB), sob protocolo de nº **008/23**, em **reunião ordinária de 22.11.2023**.

IMPORTANTE: entregar ao final do projeto o relatório final.

Vigência do projeto	22/01/2024 a 31/07/2025
Espécies / Linhagem	<i>Boana faber</i>
Nº de animais	200
Idade / Peso	Estágio Larval/ 500mg
Sexo	Indefinido
Origem	Proximidades Camping Cachoeira Formosa – Rio dos Cedros-SC.

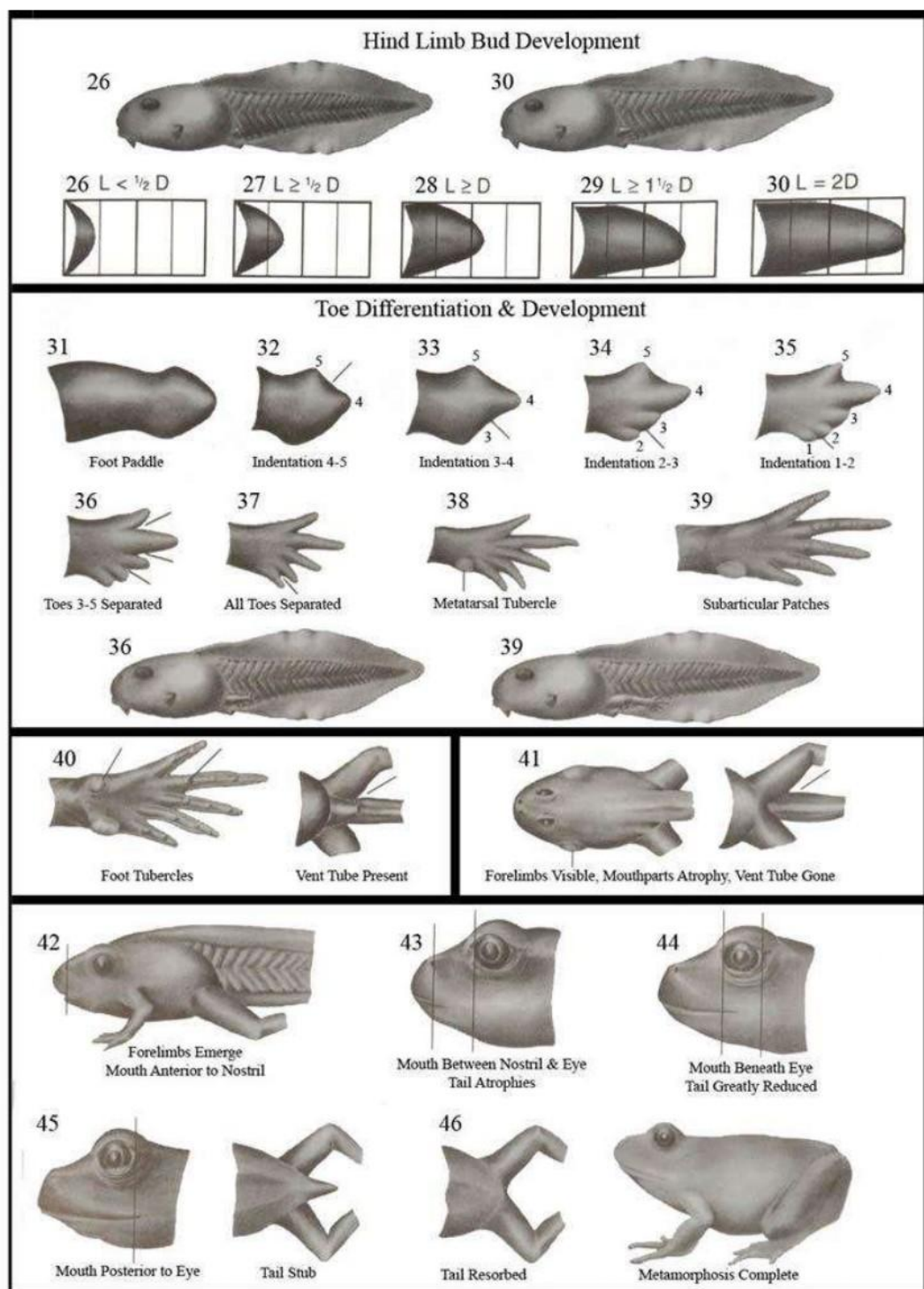
Blumenau, 22 de março de 2024.

Sérgio Luiz Althoff

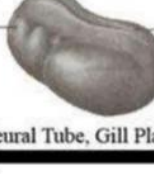
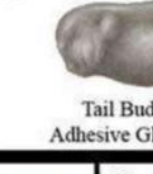
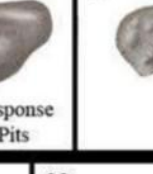
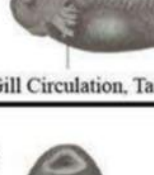
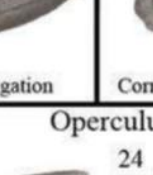
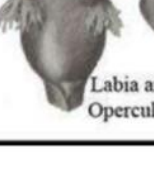
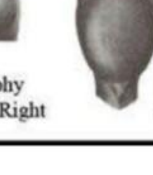
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais/FURB

ANEXO C – Estágios de desenvolvimento de Gosner

L
A
R
V
A
E



EMBRYOS

1  Fertilization	2  Gray Crescent	3  2-Cell	4  4-Cell	5  8-Cell
6  16-Cell	7  32-Cell	8  Midcleavage	9  Late Cleavage	10  Dorsal Lip
11  Yolk Plug	12  Late Gastrula	13  Neural Plate	14  Neural Folds	15  Elongation, Rotation
16  Neural Tube, Gill Plates	17  Tail Bud Adhesive Gland	18  Muscular Response Olfactory Pits	19  Heart Beat Gill Buds	
20  Gill Circulation, Tail Elongation	21  Cornea Transparent, Mouth Opens	22  Tail Fins Transparent, Fin Circulation	Operculum, Oral Disc, and Pigmentation	
23  Labia and Teeth Differentiate Operculum Covers Gill Bases	24  External Gills Atrophy Operculum Closes on Right	25  Mouthparts Obvious Spiracle Forms on Left		

HATCHLINGS