

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

POLIANA NAZARIO SCHMIT

**EFEITOS DE DIFERENTES USOS E OCUPAÇÕES DO SOLO EM UNIDADE DE
CONSERVAÇÃO NA GENOTOXICIDADE DE ANFÍBIOS**

FRANCISCO BELTRÃO/PR

2022

POLIANA NAZARIO SCHMIT

**EFEITOS DE DIFERENTES USOS E OCUPAÇÕES DO SOLO EM UNIDADE DE
CONSERVAÇÃO NA GENOTOXICIDADE DE ANFÍBIOS**

**Effects of different use and occupation of soil in a conservation unit on
amphibian genotoxicity**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Lingnau

Coorientadora: Prof^a. Dra. Elisângela Düsman

FRANCISCO BELTRÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Francisco Beltrão**



POLIANA NAZARIO SCHMIT

**EFEITOS DE DIFERENTES USOS E OCUPAÇÕES DO SOLO EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO NA
GENOTOXICIDADE DE ANFÍBIOS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental: Análise E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 20 de Dezembro de 2022

Dr. Rodrigo Lingnau, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Daniela De Melo E Silva, Doutorado - Universidade Federal de Goiás (Ufg)

Dra. Ticiane Sauer Pokrywiecki, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 20/12/2022.

AGRADECIMENTOS

Meu profundo agradecimento aos que me acolheram nessa jornada, quando eu mesma não tinha mais fôlego e nada mais fazia sentido pelas complicações da gestação e perda da minha filha. Obrigada pela solidariedade e compreensão.

Sou grata, ao meu Orientador Prof. Dr. Rodrigo Lingnau pela oportunidade, incentivo e conselhos, partilhando comigo seus conhecimentos, com dedicação e perseverança em tudo o que faz. Obrigado por abdicar muitas vezes os momentos de descanso para me orientar e participar das idas a campo.

A minha Coorientadora Prof^a. Dra. Elisângela Düsman, pela confiança depositada, apoio e valiosos ensinamentos na área de mutagenicidade.

Ao meu esposo Ronaldo, por acreditar nas minhas escolhas, pelo carinho e presença incondicional nos momentos difíceis que passamos juntos.

A meus pais, por serem meu porto seguro e exemplo de vida.

Aos amigos, em especial Cleocir e Neuza, pela ajuda inestimável nas coletas, constante preocupação, incentivo, carinho e amizade.

Ao ICMBIO e aos proprietários que permitiram a realização da pesquisa na Unidade de Conservação.

Ao projeto Integridade Ambiental do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas: suas águas e seus anfíbios associados, pelo auxílio financeiro.

A todos os professores do PPGEA pelo aprendizado durante o mestrado. Em especial, ao professor Fernando Cesar Manosso, pela orientação no Sistema de Informação Geográfica (QGIS).

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental (PPGEA) pela oportunidade de aprimoramento acadêmico.

Deixo meu agradecimento também a todos os professores membro da minha banca de dissertação pela disponibilidade e participação para enriquecer o trabalho.

RESUMO

O Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP) é formado por campos naturais e capões de Mata com Araucária. A fisionomia campestre da região ao longo dos anos vem sofrendo rupturas impulsionadas pela agricultura e silvicultura, principalmente as incorporadas dentro do RVS-CP. A destruição das paisagens naturais e uso intensivo de agroquímicos convergem para mudanças ambientais e exposição a poluentes xenobióticos. Desta forma, o presente estudo objetivou investigar a genotoxicidade, pelo teste do micronúcleo (MN), para as espécies *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus luctator*, coletadas na região do RVS-CP, em áreas de campo nativo (CN1 e CN2), silvicultura (SIL1 e SIL2) e agricultura (AGRI1 e AGRI2), bem como avaliou as características físico-químicas da água e do sedimento das lagoas. Os resultados dos parâmetros químicos da água revelam valores adequados para potencial hidrogeniônico (pH), temperatura (T°C), sólidos dissolvidos totais (TDS) e condutividade (SI), enquanto potencial de oxirredução (ORP), oxigênio dissolvido (%OD), turbidez (TNU), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) sofreram flutuações de valores entre as datas de coleta e o local amostrado. A ocorrência de agroquímicos no sedimento foi registrada exclusivamente em AGR1, com identificação de 8 diferentes princípios ativos, entre os quais o inseticida Imidacloprido apresentou maior concentração. Dentre as espécies avaliadas e os ambientes amostrados não foram evidenciadas frequências significativas de MN e anormalidades eritrocitárias, porém quando as frequências médias de MN e alterações nucleares foram geradas por ambiente avaliado registrou-se aumento significativo na área de silvicultura associado aos parâmetros DBO, DQO, TNU e ORP. A Análise dos componentes principais (PCA) revelou que há correlação positiva entre as frequências de alterações nucleares com o ORP, TNU e agroquímicos. Nesse âmbito, a ausência ou baixa frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares, demonstram que os estudos *in situ*, sofrem a interferência da dinâmica do ambiente e estão sujeitos a estressores antropogênicos e naturais que influenciam diretamente na ação biológica dos organismos.

Palavras-chave: bioindicadores; genotoxicidade; micronúcleo; *in situ*, silvicultura; agricultura; parâmetros físico-químicos.

ABSTRACT

The Campos de Palmas Wildlife Refuge (RVS-CP) is composed by natural fields and remnants of Araucaria Forest. The rural physiognomy of the region over the years has suffered ruptures driven by agriculture and forestry, especially those incorporated within the RVS-CP. Destruction of natural landscapes and intensive use of agrochemicals converge to environmental changes and exposure to xenobiotic pollutants. Thus, the present study aimed to investigate genotoxicity, using the micronucleus test (MN), for the species *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus* and *Leptodactylus luctator*, collected in the RVS-CP region, in areas of native grassland (CN1 and CN2), forestry (SIL1 and SIL2) and agriculture (AGRI1 and AGRI2), as well as evaluating the physicochemical characteristics of the water and sediment of the lakes. The results of the chemical parameters of the water reveal adequate values for hydrogenic potential (pH), temperature (T°C), total dissolved solids (TDS) and conductivity (SI), while oxidation-reduction potential (ORP), dissolved oxygen (%OD), turbidity (TNU), biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) have fluctuated values between the collection dates and the sampled locations. The occurrence of agrochemicals in the sediment was recorded exclusively in AGR1, with the identification of 8 different active principles, among which the insecticide Imidacloprid had the highest concentration. Among the evaluated species and sampled environments, no significant frequencies of MN and erythrocyte abnormality collected in an agricultural environment, silviculture in relation to the preserved area, but when the average frequencies of MN and nuclear alterations were generated by the evaluated environment, a significant increase was recorded in the silviculture area associated with the BOD, DQO, NTU and ORP parameters. Principal component analysis (PCA) in analogy revealed that there is a positive correlation between the frequencies of nuclear alterations with ORP, NTU and agrochemicals. In this context, the absence or low frequency of micronuclei and other nuclear changes demonstrate that *in situ* studies suffer interference from the dynamics of the environment and are subject to anthropogenic and natural stressors that directly influence the biological action of organisms.

Keywords: bioindicators; genotoxicity; micronucleus; *in situ*, forestry; agriculture; physicochemical parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas	31
Figura 2. Principais Sub-bacias no RVS-CP	33
Figura 4. Locais amostrados na região da Unidade de Conservação RVS-CP..	36
A: CN1, B: CN2, C: SIL1, D: SIL 2, E: AGRI 1, F: AGRI 2.	36
Figura 5. Espécie <i>Physalaemus cuvieri</i> amostrada (a) e ninho de espuma em pegada de gado (b).	37
Figura 6. Espécie <i>Dendropsophus minutus</i> amostrada (a) e vocalização em arbusto (b).....	37
Figura 7. Espécie <i>Leptodactylus luctator</i> amostrada (a) e registro de <i>L. luctator</i> em área aberta (b).	37
Figura 8. Média da frequência de MN e alterações nucleares nas espécies <i>P.</i> <i>cuvieri</i>	51
<i>D. minutus</i>	51
Figura 9. Média da frequência de MN e alterações nucleares de cada ponto de coleta.....	52
Figura 10. Média da frequência de MN e alterações nucleares nos três ambientes amostrados.	54
Figura 12. Variação morfológica nos eritrócitos avaliados nas espécies <i>P.</i> <i>cuvieri</i> , <i>D. minutus</i> e <i>L. luctator</i> . a) eritrócito normal. b) eritrócito micronucleado. c) célula com broto. d) célula reniforme. e) célula binucleada. f) célula segmentada.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos <i>in situ</i> relacionados a qualidade da água e anfíbios	26
Tabela 2. Descrição e localização dos pontos de coleta	35
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água obtidos entre novembro/2019 a fevereiro/2021	43
Tabela 4. Resíduos de agroquímicos (mg Kg^{-1}) identificados nos sedimentos.	47
Tabela 5. Células totais analisadas observadas em 2000 eritrócitos para cada indivíduo estudado e alterações eritrocitárias nucleares encontradas.	50
Tabela 6. Locais amostrados, relação das espécies estudadas por ponto de coleta, número de células analisadas observadas em 2000 eritrócitos para cada indivíduo e alterações eritrocitárias nucleares encontradas.	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	REVISÃO DA LITERATURA	16
4.1	Biologia dos anfíbios anuros	16
4.2	Anfíbios e a poluição aquática	18
4.3	Biomonitoramento e bioindicadores	19
4.4	Anfíbios como bioindicadores	20
4.5	Biomarcadores e o Teste do micronúcleo	21
4.6	Qualidade de águas aplicadas a anfíbios	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	Caracterização da área de estudo	31
5.1.2	Locais amostrados	34
5.2	Animais ensaio	36
5.2.1	<i>Physalaemus cuvieri</i> (Fitzinger, 1826).....	38
5.2.2	<i>Dendropsophus minutus</i> (Peters, 1872).....	38
5.2.3	<i>Leptodactylus luctator</i> (Hudson, 1892).....	39
5.2.4	Coleta dos exemplares da espécie	39
5.3	Teste do micronúcleo	40
5.4	Coleta e caracterização da água e sedimentos	41
5.4.2	Caracterização da água	41
5.4.3	Caracterização do sedimento	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1	Parâmetros físico-químicos	43
6.2	Micronúcleos e alterações nucleares	50
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

As disparidades de poluentes xenobióticos presentes no ambiente ajudam a justificar a razão pela qual os impactos ambientais produzem diferentes resultados, com tendências de aumento à exposição a agentes mutagênicos e genotóxicos e, conseqüentemente, efeitos nocivos aos ecossistemas e a todos os seres vivos (ARCAUTE *et al.*, 2014; BOLOGNESI, 2003; FARAG; ALAGAWANY, 2018; GADZAŁA-KOPCIUCH, *et al.*, 2004; PELUSO *et al.*, 2019). A relevância e preocupação crescentes com esses poluentes se expressa principalmente em relação ao ecossistema aquático, recurso natural vulnerável as ações antrópicas e indispensável para manutenção do meio ambiente (REID *et al.*, 2019; VÖRÖSMARTY *et al.*, 2010).

Entre os táxons existentes nos ecossistemas aquáticos, os anfíbios desenvolvem uma peculiar relação com esse meio, sendo considerados excelentes bioindicadores da qualidade do meio ambiente e potencialmente importantes no monitoramento ambiental (ARCAUTE *et al.*, 2014; BRÜHL *et al.*, 2011; CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; IUCN, 2020). Essa posição é atribuída a esses animais por serem extremamente sensíveis aos efeitos das variações ambientais, e talvez, seja essa a explicação para muitos declínios populacionais de anfíbios ocorrerem sem quaisquer alterações perceptíveis do habitat (GAUTHIER *et al.* 2004; STUART *et al.*, 2004).

Suas características biológicas e ecológicas, incluindo metabolismo, ciclo de vida aquático, pele bastante permeável, ovos e girinos sensíveis a contaminantes presentes no ar e na água, época reprodutiva influenciada por fatores climáticos, grande fidelidade ao habitat, uso de ambientes aquáticos e terrestres e reduzida capacidade de dispersão, torna os anfíbios bioindicadores notáveis, capazes de fornecerem referências da presença de poluentes no ecossistema (ADAMS; BRÜHL, 2020; BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2020; BORGES *et al.*, 2019; CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; FANALI *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2017). Os anfíbios possuem singular relevância nos estudos toxicológicos, em avaliação dos efeitos de agentes mutagênicos e genotóxicos no ácido desoxirribonucleico (DNA). Pesquisas demonstram a suscetibilidade genotóxica de anfíbios expostos a contaminantes presentes no ambiente (ARCAUTE *et al.*, 2014; BABINI *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2019; GAUTHIER *et al.*, 2004). Os efeitos genotóxicos revelam sua interferência afetando diretamente o genoma, impulsionando quebras no DNA, danos no material genético, alterações nas cromátides irmãs e até mesmo, caso as lesões não sejam reparadas,

mutações que podem desencadear processos carcinogênicos (DEARFIELD *et al.*, 2002). Além disso, em anfíbios, pode levar a uma série de efeitos como dano genético e hepático, anormalidades morfológicas, supressão das defesas imunológicas e afetar o crescimento (CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; FANALI *et al.*, 2018, PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2019).

Dentre as técnicas utilizadas para avaliar as consequências dos agentes mutagênicos e genotóxicos em anfíbios, destaca-se o teste do micronúcleo. O teste consiste na análise de eritrócitos para identificar alterações cromossômicas e tem se mostrado bastante promissor devido ao ensaio ser notavelmente mais simples, confiável e eficaz, fornecendo um sinal de alerta precoce da detecção de danos (BABINI *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2019; CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; UDROIU *et al.*, 2015).

Alguns estudos demonstram que os danos observados em anfíbios podem estar correlacionados às áreas de cultivo agrícola, criação extensiva de gado e a utilização de grandes extensões de terra para o plantio de monoculturas com espécies exóticas (BABINI *et al.*, 2016; FOKOUA *et al.*, 2019; HEINEN 1992; KRISHNA *et al.*, 2005; PARRIS; LINDENMAYER, 2004; PINEDA; HALFFTER, 2004; WALDICK *et al.*, 1999). A vulnerabilidade a que estão expostos em terras agrícolas se dá pelo uso intensivo de agroquímicos, pois eles dispersam-se no ambiente e persistem nas cadeias tróficas causando efeitos letais e subletais sobre anfíbios (BOCCIONI, *et al.*, 2021; BORGES *et al.*, 2019; MCDANIEL *et al.*, 2004; METTS *et al.*, 2012; ROWE *et al.*, 2002, SIEVERS, *et al.*, 2019). O plantio de espécies exóticas e a pecuária também revelam sua interferência, as quais estão vinculadas as alteração e destruição das paisagens naturais, podendo levar ao declínio populacional desses animais (COLLINS; STORFER, 2003).

Os anuros *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus luctator* possuem ampla distribuição geográfica na América do Sul (FROST, 2022; KWET *et al.*, 2010; MIJARES *et al.*, 2010). São espécies altamente adaptáveis as mudanças ambientais e abundantes em diversos habitats, incluindo campos abertos, região de pastagem e áreas inundadas (GONÇALVES *et al.*, 2019; KWET *et al.* 2010; MIJARES *et al.*, 2010). Pesquisas recentes veem utilizando uma abordagem de estudo com essas espécies para avaliação da genotoxicidade, demonstrando que esses anuros podem ser empregados para o monitoramento ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2020; BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2020; BORGES *et al.*, 2019; FANALI *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2019; SLABY, *et al.*, 2019).

Assim, objetivando contribuir para o conhecimento dos estudos genotóxicos em anfíbios, o presente trabalho avaliou a genotoxicidade de três espécies de anuros *in situ* coletados na Unidade de Conservação (UC) Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP), em áreas de campo natural, silvicultura e agricultura, utilizando o teste do micronúcleo como biomarcador.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a genotoxicidade em exemplares de três espécies de anuros coletados na região do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP), em áreas de campo natural, silvicultura e agricultura.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Analisar a frequência de células micronucleadas e de anormalidades nucleares de exemplares de *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus luctator* nas áreas de estudo.

2.2.2 Comparar como os diferentes usos e ocupações do solo da área de estudo interferem na genotoxicidade desses anfíbios anuros.

2.2.3 Avaliar as características físico-químicas da água e do sedimento das lagoas onde os animais forem coletados.

2.2.4 Investigar se a genotoxicidade é influenciada pelas características físico-químicas da água e sedimento onde estes animais habitam.

3 JUSTIFICATIVA

As atuais evidências apontam, claramente, para uma direção futura: as mudanças ambientais aumentarão, bem como o risco de exposição a poluentes mutagênicos e genotóxicos que irão trazer efeitos nocivos ao ecossistema e aos seres vivos expostos (ARCAUTE *et al.*, 2014; BOLOGNESI, 2003; FARAG; ALAGAWANY, 2018; GADZAŁA-KOPCIUCH, *et al.*, 2004; PELUSO *et al.*, 2019). Embora a gama de riscos que envolvem alterações ambientais não se restrinja a exposição de poluentes, as informações antecipadas da qualidade do ambiente podem ser consideradas uma primeira linha de defesa a essas alterações (BONEBRAKE *et al.*, 2019; CARPENTER *et al.*, 2011; FICKEN, BYRNE, 2013; GADZAŁA-KOPCIUCH *et al.*, 2004; VÖRÖSMARTY *et al.*, 2010).

A Unidade de Conservação RVS-CP, formada por campos naturais e capões de Mata com Araucária (Floresta Ombrófila Mista) encontra-se inserida em meio a problemática ambiental. Antes da criação da Unidade de Conservação, as mudanças no uso do solo alteraram consideravelmente a paisagem da região, sendo que a agricultura e a silvicultura ocuparam muitas áreas de campos nativos (STRAPAZZON, 2015). A partir da criação da Unidade de Conservação, muitas dessas atividades foram mantidas, considerando que a UC é composta por propriedades privadas que mantêm a mecanização da agricultura, monocultivos agrícolas e florestais, e o pastoreio incorporados ao RVS-CP e ao seu entorno (BERNARDON; SOARES, 2016; ICMBIO, 2016).

Os riscos observados pela presença de áreas plantadas na Unidade de Conservação conforme Plano de Manejo do RVS-CP estão intimamente associados a perda de áreas campestres remanescentes e habitats, aliados a contaminação do solo e dos cursos d'água com comprometimento da qualidade hídrica das nascentes por agroquímicos (ICMBIO, 2016). Não obstante, os Campos de Palmas na sua totalidade já somam cerca de 50% da cobertura original destruída ou profundamente alterada (BERNARDON; SOARES, 2016). Frente a essa perspectiva, os anfíbios estão presentes nesses ecossistemas afetados e podem ser empregados como bioindicadores. Pesquisas demonstram sua particular importância para estudos toxicológicos, para avaliar efeitos de agentes mutagênicos e genotóxicos no DNA, fornecendo informações precoces da presença de poluentes no ecossistema, atuando como sinal de alerta diante das modificações do ambiente (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2020). Essa posição é atribuída a esses animais por serem extremamente sensíveis aos efeitos das variações ambientais devido suas

características biológicas e ecológicas. Além disso, a avaliação com anfíbios *in situ* permite informações toxicológicas específicas do local, devido à fidelidade ao habitat e reduzida capacidade de dispersão (ARCAUTE *et al.*, 2014; BRÜHL *et al.*, 2011; FICKEN, BYRNE, 2013; HAYES *et al.*, 2006; HAYES *et al.*, 2010; NIKOLOFF *et al.*, 2014).

Nesse âmbito, o presente estudo visou avaliar a genotoxicidade em três espécies de anuros e fornecer informações das condições ambientais em áreas de campo natural, silvicultura e agricultura na região do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP); bem como contribuir coadjuvamente ao projeto "Integridade Ambiental do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas: suas águas e seus anfíbios associados", licença ambiental n° 63844-1.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Biologia dos anfíbios anuros

Existem três ordens de anfíbios: Anura, Caudata e Gymnophiona, que formam um grupo evolutivo monofilético. São conhecidos como sapos, rãs e pererecas os que pertencem à ordem anura, salamandras ou tritões para a ordem caudata e cecílias para a ordem gymnophiona (HADDAD, 2008).

Entre as três ordens de anfíbios, a ordem anura é a maior representante da classe, com mais de 7.500 espécies (FROST, 2022). São animais que apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo predominantemente de regiões tropicais e temperadas. A maior diversidade de anfíbios é encontrada no Brasil com 1.188 espécies catalogadas (SEGALLA *et al.*, 2021).

Os anuros possuem uma morfologia especializada, onde a característica mais evidente desse sucesso é a estrutura esquelética adaptada para o salto, os membros pélvicos e os músculos que formam um sistema de alavanca permitindo arremessar o animal. As principais especializações morfológicas associadas a esse tipo de locomoção é a fusão da tíbia e fíbula, alongamento dos membros pélvicos, coluna vertebral curta e rígida ligada à pelve, presença de vértebras caudais fundidas ao uróstilo, membros peitorais fortes e cintura peitoral flexível (POUGH *et al.*, 2003; VITT; CALDWELL, 2014).

São animais ectotérmicos e possuem a pele úmida e glandular, bastante permeável e sensível. A umidade e a permeabilidade da pele são mantidas por glândulas mucosas que estão distribuídas por toda a superfície do corpo e secretam compostos mucopolissacarídeos. Além dessas glândulas os anuros podem apresentar glândulas serosas, granulares e mistas (mucosas e serosas) (POUGH *et al.*, 2003). No tegumento podem ser encontradas uma grande variedade de substâncias farmacologicamente ativas (aminas biogênicas, peptídeos, alcalóides), algumas são extremamente tóxicas, e possuem a função de proteção contra agentes infecciosos como fungos e bactérias ou mesmo contra predadores em potencial (BRIZZI *et al.*, 2002).

O sistema respiratório desses animais revela sua posição de transição entre o meio terrestre e aquático, na fase larval a maioria das espécies respiram por intermédio de brânquias, que são estruturas externas e filamentosas (VITT; CALDWELL, 2014). Já os anuros adultos podem utilizar três superfícies respiratórias: a pele (respiração

cutânea), a boca (respiração bucal) e os pulmões. Os pulmões desses animais são sacos elásticos ovais com superfície interna dividida em septos e subdivididas em alvéolos. A respiração pulmonar é realizada através de pressão positiva, forçando o ar para dentro para encher os pulmões (HICKMAN *et al.*, 2004). Os anuros apresentam dependência crescente dos pulmões para a ingestão de oxigênio à medida que aumenta sua temperatura e atividade. Outra forma de respiração característica é a respiração cutânea, cuja a troca gasosa ocorre por diferença de pressão na tensão superficial encontrada entre a pele úmida e o ar (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Todos os anfíbios dependem da superfície do tegumento para as trocas gasosas, especialmente para a liberação de dióxido de carbono (POUGH *et al.*, 2003).

O coração, diferentemente dos peixes, recebe tanto o sangue oxigenado, proveniente dos pulmões como sangue não oxigenado, proveniente do corpo, porém de forma parcialmente separada (POUGH *et al.*, 2003). Para evitar a mistura excessiva dos dois tipos de sangue o sistema circulatório é duplo (HICKMAN *et al.*, 2004). Segundo Pough *et al.* (2003), o coração dos anfíbios reflete o uso de duas superfícies respiratórias nos padrões de fluxo sanguíneo dentro do coração e da distribuição de sangue oxigenado e não oxigenado a diversas partes do corpo.

Os anuros são importantes consumidores terciários ou quaternários em ecossistemas florestais, alimentam-se de insetos, aranhas, minhocas, lesmas, caracóis, centopeias entre outros. Desempenham importante papel na regulação da dinâmica de nutrientes da floresta, controlando a densidade de suas presas. No estágio larval são usualmente filtradores carnívoros ou herbívoros, alimentando-se principalmente de algas e restos de animais e vegetais mortos (HADDAD, 2008; STEWARD; WOOLBRIGHT, 1996).

Os anfíbios são presas em potencial para todas as classes de vertebrados e muitos invertebrados. A predação pode ocorrer tanto na fase de ovo, estágio larval, jovem ou adulto (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Como mecanismo de defesa dos predadores, algumas espécies anunciam suas propriedades tóxicas por meio de cores e comportamento aposemáticos, outros dão longos pulos para escapar, alguns simulam a morte, espécies de grande porte inflam os pulmões aumentando de tamanho aparente e atacam o predador, há ainda espécies que utilizam o mimetismo para enganar os predadores (POUGH *et al.*, 2003).

4.2 Anfíbios e a poluição aquática

No decorrer da história humana tem-se constatado o apogeu da intervenção do homem sobre o planeta e, as águas doces superficiais - lagos, reservatórios e rios - estão entre os ecossistemas mais amplamente afetados. A expansão das atividades antrópicas, alterou extensivamente as águas do planeta, gerando impactos na estrutura física e química, mudanças nos processos ecossistêmicos e nas características bióticas do meio aquático (CARPENTER *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2020; REID *et al.*, 2019).

Atualmente configurada como o foco de preocupação internacional sob a ótica do meio ambiente, o comprometimento do meio aquático e sua biodiversidade incitam o delineamento de perspectivas de ações legais e análises ambientais a fim de proteger ou reabilitar esse ecossistema (REID *et al.*, 2019; VÖRÖSMARTY *et al.*, 2010).

Entre as inúmeras ameaças ao ambiente aquático, as mais recentes são as mudanças climáticas, invasões biológicas, doenças infecciosas, florações de algas prejudiciais, expansão hidrelétrica; poluição luminosa, ruídos, salinização da água, declínio de concentrações de cálcio; estressores cumulativos, poluição microplástica e contaminantes emergentes. Esses últimos chamam ampla atenção por causa de sua atividade biológica inesperada ou desconhecida e persistência em ambientes aquáticos, sendo que incluem fármacos, produtos de higiene pessoal, surfactantes, plastificantes, pesticidas; desreguladores endócrinos e nanomateriais (ATTADEMO *et al.*, 2022; PATEL *et al.*, 2020; REID *et al.*, 2019).

Ainda entre os riscos ao ecossistema aquático, destacam-se as mudanças no uso da terra, atribuídos principalmente às áreas urbanas, áreas agrícolas e a alta densidade de gado bovino que adicionam lodo, elevadas concentrações de nutrientes e poluentes tóxicos para as águas superficiais (CARPENTER *et al.*, 1998; CARPENTER *et al.*, 2011; NAIMAN; DUDGEON, 2011).

Os ecossistemas de água doce estão perdendo espécies mais rapidamente do que os ecossistemas marinhos ou terrestres, muitas delas estão sendo extintas antes mesmo de terem sido reconhecidas e estudadas pela comunidade científica. Os relatórios demonstram que quase um terço das espécies do ecossistema aquático está ameaçado de extinção e mais de 200 espécies já estão extintas (IUCN, 2020).

Essas alterações hidrológicas também vêm afetando drasticamente as populações de anfíbios no mundo todo, de acordo com a avaliação da Lista Vermelha da

IUCN, 41% dos anfíbios estão ameaçadas de extinção, em razão da sua intrínseca relação com o meio aquático, que os tornam mais suscetíveis aos contaminantes (ARCAUTE *et al.*, 2014; BRÜHL *et al.*, 2011; CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; IUCN, 2020).

Estudos recentes têm relatado a conexão entre os contaminantes e os anfíbios, alertando que os mesmos podem estar expostos como indivíduos, população e comunidade. As evidências relacionam efeitos adversos principalmente às espécies que se reproduzem em corpos d'água, pois estão diretamente sujeitas a poluentes, que podem levar ao declínio populacional. A exemplo, a contaminação ambiental pode afetar os primeiros estágios do desenvolvimento larval, alterar o comportamento por vias fisiológicas e neurológicas, aumentando a mortalidade e a suscetibilidade genotóxica e diminuindo o número de metamorfos (BABINI *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2019; HAYES *et al.*, 2010; GAVEL *et al.*, 2021; SIEVERS *et al.*, 2018). Além disso, algumas pesquisas demonstram uma correlação entre o dano genético em anfíbios com o tamanho do corpo de água, ou seja, quanto menor o tamanho do ecossistema aquático, maiores serão os danos no DNA (GONÇALVES *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a relevância e preocupação crescentes em relação ao meio ambiente aquático requer um diagnóstico das ameaças em uma ampla gama de escalas, do global ao local, operações voltadas à conservação desse ecossistema para sua preservação e reabilitação, além de políticas públicas mais coerentes e efetivas a fim de assegurar a segurança da água tanto para os seres humanos quanto para a biodiversidade de água doce (REID *et al.*, 2019; VOROSMARTY *et al.*, 2010).

4.3 Biomonitoramento e bioindicadores

A vertente da poluição ambiental pode ser atribuída a uma gama de fatores resultantes de novas tecnologias industriais e agrícolas, em conjunto com mudanças em nosso modo de vida, atribuídos principalmente ao consumo de produtos farmacêuticos, produtos para cuidados pessoais, surfactantes, plastificantes, pesticidas, entre outros (GAUTHIER *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2020).

Frente aos avanços da poluição e as consequências ao ecossistema e aos seres vivos, o biomonitoramento vem sendo uma ferramenta para avaliação de impactos ambientais. A aplicação dessa técnica tem por objetivo estimar o comportamento do

poluente no ambiente, monitorando sua ação nos organismos vivos através de bioindicadores (GADZAŁA-KOPCIUCH *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2008).

Os bioindicadores incluem espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições podem revelar as pressões exercidas sobre o meio ambiente, avaliando qualitativamente as respostas bióticas ao stress ambiental, monitorando o ambiente através das alterações físicas e químicas, os processos ecológicos e a biodiversidade. Sua aplicabilidade é reconhecida devido à biota poder prever o impacto cumulativo de várias pressões e alterações de habitat ao longo do tempo (HOLT; MILLER, 2011).

Essa abordagem através do biomonitoramento com bioindicadores vem agregar as avaliações ambientais e alertar o grau de vulnerabilidade dos ecossistemas, uma vez que os métodos de monitoramento físico-químicos sem a associação com as respostas biológicas não mostram de forma eficiente os efeitos de agentes estressores (HOLT; MILLER, 2011; ZHOU *et al.*, 2008).

As análises físico-químicas caracterizam as condições no momento da amostragem, entretanto não são capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema, enquanto os bioindicadores integram as flutuações ambientais, adicionam um componente temporal correspondente à vida útil ou tempo de um organismo em um sistema particular, permitindo a integração de condições ambientais atuais, futuras ou passadas. Além disso, possuem a capacidade de indicar os efeitos bióticos indiretos de poluentes quando muitas medições físicas ou químicas não o fazem (GONÇALVES *et al.*, 2012; HOLT; MILLER, 2011).

4.4 Anfíbios como bioindicadores

Vários organismos aquáticos como as algas, macrófitas, zooplâncton, insetos, moluscos bivalves, gastrópodes, peixes e anfíbios, podem ser usados como indicadores das mudanças nos habitats (ZHOU *et al.*, 2008). Entre os táxons mais utilizados, os anfíbios desenvolvem uma conexão peculiar no ecossistema fornecem uma estimativa realista da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos em especial pela sua história de vida, associada ao processo de metamorfose (BABINI *et al.*, 2016; PATAR *et al.* 2016).

Pesquisas demonstram que os girinos são capazes de fornecer informações fundamentais da qualidade do ecossistema aquático. A contaminação ambiental pode

afetar os primeiros estágios do desenvolvimento larval, alterar o comportamento por vias fisiológicas e neurológicas, acarretar problemas no desenvolvimento, bioacumulação, alta prevalência de anormalidades morfológicas, redução das taxas de sobrevivência, diminuição de metamorfos e aumento da mortalidade (BABINI *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2019; BOUALIT, *et al.*, 2022; HAYES *et al.*, 2010; JING *et al.*, 2017; SIEVERS *et al.*, 2018, SIEVERS *et al.*, 2019).

Indivíduos adultos também são vulneráveis, podendo apresentar altos índices de dano genético, alterações nucleares, malformações e supressão das defesas imunológicas. Além disso, a presença de contaminantes pode influenciar negativamente a riqueza e distribuição de espécies (CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; FANALI *et al.*, 2018; FICKEN; BYRNE, 2013).

Assim, o uso desses animais como bioindicadores e suas informações fisiológicas, são ferramentas importantes para o monitoramento ambiental, fornecendo referências extemporâneas da presença de poluentes no ecossistema (BABINI *et al.*, 2016; BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2020; BORGES *et al.*, 2019; CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017; FANALI *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2019).

4.5 Biomarcadores e o Teste do micronúcleo

Os xenobióticos são substâncias químicas alheias ao sistema biológico, produzidos pela indústria química ou pela natureza, que podem ser enquadrados em diversas categorias, como por exemplo, pesticidas agrícolas, inseticidas, plastificantes, produtos de limpeza, solventes, fármacos, etc. (SILVA; FAY, 2004). Esses xenobióticos em contato com o ecossistema, dependendo da sua concentração, estabilidade, taxa de migração e bioacumulação podem exibir efeitos tóxicos nos organismos vivos e induzir mudanças no ambiente (GADZAŁA-KOPCIUCH *et al.*, 2004; SILVA; FAY, 2004).

Considerando o efeito negativo nos organismos vivos, inúmeras pesquisas veem utilizando biomarcadores. Um biomarcador é qualquer mudança na resposta biológica, que sinalize a exposição ou efeito de um xenobiótico através de alteração bioquímica, celular, molecular ou variações fisiológicas nas células, fluídos, órgãos ou ainda tecidos de um ser vivo (LAM; GRAY, 2003).

Dentre os diversos posicionamentos, é essencial esclarecer que um biomarcador é diferente de um bioindicador. O biomarcador refere-se a qualquer resposta biológica

para substâncias xenobióticas presente no ambiente, possível de ser medida dentro do organismo ou em seus produtos (pêlos, urina, sangue, etc.). O bioindicador relaciona-se ao organismo do qual se está obtendo as informações das condições ambientais do seu habitat (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996).

Entre as técnicas amplamente empregadas para biomarcadores de substâncias genotóxicas no ambiente e detecção de mutações cromossômicas evidenciam-se os testes do cometa e micronúcleo (MN). O ensaio do cometa, também conhecido como Eletroforese em Microgel de Célula Única, é uma técnica empregada para avaliar a presença de lesões no DNA, sendo que as células com material nuclear lesionado se assemelham a um cometa devido sua morfologia, na qual o DNA perde sua integridade, e migra por força da eletroforese. A vantagem do teste dá-se principalmente pela alta sensibilidade para a detecção de danos no DNA. Em contraponto, o ensaio do micronúcleo consiste na análise de eritrócitos para identificar mutagênese cromossômica e tem se mostrado vantajoso, por ser consideravelmente mais acessível e simples em relação ao ensaio do cometa (BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2020; COLLINS, 2004; CRUZ-ESQUIVEL *et al.*, 2017).

Os micronúcleos são corpúsculos extranucleares decorrentes da perda de cromossomos inteiros ou apenas fragmentos de cromossomos que não migraram para o núcleo principal após a divisão mitótica, estes fragmentos não são incluídos nos núcleos das células filhas originando assim a formação de um micronúcleo (ALBERTINI *et al.*, 2000; FENECH, 2000; PANTALEÃO *et al.*, 2006).

Nesse sentido, o teste MN pode identificar mutagênese cromossômica, como clastogênese e aneugênese. A primeira refere-se aos efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas, com eventos de dano diretamente no cromossomo e seus componentes, notadamente no DNA, enquanto a segunda afeta os componentes do fuso ou da região centromérica, com eventos que causam danos no mecanismo do fuso e outros componentes envolvidos na separação dos cromossomos (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Para a aplicação desse ensaio, é importante observar que a formação de MN, só pode ser analisada após a ocorrência da divisão celular, sendo a frequência de MN associada ao tempo que a célula leva para entrar em divisão, o tipo de tecido, a espécie

bioindicadora e as condições ambientais envolvidas (FENECH, 2000; UDROIU *et al.*, 2015).

Assim, a metodologia MN aplicada para anfíbios é baseada na análise de eritrócitos, de acordo com critérios específicos, no qual os micronúcleos são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula, com diâmetro correspondente entre 1/16 e 1/3 do núcleo principal, possuindo bordas distinguíveis e com a mesma refração e cor do núcleo principal (BABINI *et al.*, 2016).

4.6 Qualidade de águas aplicadas a anfíbios

As pesquisas que contribuem para o entendimento dos parâmetros de qualidade da água para anfíbios ainda são bastante complexos, principalmente devido à dinâmica de vida desses animais e os níveis de exposição. Contudo alguns estudos compararam as respostas de anfíbios expostos a diferentes intempéries físico-químicas, relatando as possíveis concentrações em que estão mais suscetíveis.

Home e Dunson (1995) relataram as interações entre pH, metais e condutividade da água em anfíbios de duas diferentes espécies. As concentrações de metais foram análogas a estudos de campo e demonstraram que o alumínio (Al) entre 0 a 400 µg/L, aumenta significativamente a mortalidade embrionária, o cobre (Cu) associado com pH superiores a 5,50 também são extremamente tóxicos para os girinos, e o tratamento com todos os metais juntos (alumínio, cobre, ferro, zinco, cálcio, potássio, manganês chumbo) e condutividade (40 µs/cm) induziu significativamente maior mortalidade. Os resultados desse estudo demonstraram que fatores abióticos podem interagir com efeitos bióticos, como densidade e sugerir que fatores interespecíficos podem ser influenciados pelo ambiente abiótico de fundo da lagoa.

Em outros estudos, igualmente associaram os íons metálicos, como cádmio, cobre e chumbo como potencialmente perigosos para os anfíbios (FICKEN; BYRNE, 2013; GARCÍA-MUÑOZ *et al.*, 2009; MOUCHET *et al.*, 2006; PATAR *et al.*, 2016; RANATUNGE *et al.*, 2012). Ainda, Blaustein *et al.* (2003) argumentou que os metais como alumínio (Al), chumbo (Pb), zinco (Zn), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), prata (Ag), cobre (Cu), arsênico (As), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e antimônio (Sb) podem ter efeitos letais e subletais nas espécies.

O fator pH também está relacionado ao equilíbrio fisiológico em anfíbios, conforme observado por Cummins (1989), a condição ácida (pH 4) pode causar mortalidade embrionária, atraso na metamorfose e redução de tamanho em girinos. Nesse mesmo âmbito, Beattie e Tylerjones (1991) relatou que os ambientes ácidos podem alterar os níveis iônicos e reduzir o crescimento e sobrevivência. O pH associado a outras variáveis químicas como concentração de oxigênio e condutividade elétrica, de acordo com Hecnar e M'Closkey (1996), podem afetar a riqueza de espécies. Glos *et al.* (2003) reiterou que o aumento da mortalidade embrionária, a maior proporção de filhotes deformados e aumento do tempo larval estão associados a exposição a níveis baixos de pH, entretanto embriões e larvas que são expostos naturalmente a baixo pH da lagoa foram tolerantes ao pH, sendo o único efeito negativo o alongamento do período larval. Ainda há registro que pH pode influenciar potencialmente a toxicidade de metais (HOME; DUNSON, 1995).

Já a exposição a agroquímicos pode induzir uma grande variedade de defeitos morfológicos. Jofre e Karasov (1999) em pesquisa com três espécies de anfíbios anuros estudaram o efeito direto da amônia (NH), fertilizante comum na agricultura, e relataram a diminuição da sobrevivência, o aumento de deformidades e problemas no crescimento e o desenvolvimento de embriões e girinos expostos a NH superior a 0,6 mg /L (sapos verdes) ou 1,5 mg /L (sapos leopardo) e superior a 0,9 mg/L (sapos americanos), concluindo que no ecossistema, os anfíbios podem estar potencialmente expostos a níveis perigosos de NH principalmente quando hibernam no fundo ou estão enterrados em sedimentos.

Entre os inseticidas, Broomhall (2002) descreveu que a concentração subletal (0,8 mg/L) de endossulfan com temperaturas extremas podem impactar a longo prazo o condicionamento físico e desenvolvimento de girinos. Sievers *et al.* (2018) relacionaram o inseticida neonicotinóide e o cobre a alterações comportamentais fisiológicas e neurológicas, além de produzir efeitos negativos na maneira como os girinos respondem a sinais químicos. O herbicida atrazina em concentrações de 0,02 a 20 mg/L demonstraram ter efeito tóxico independente da dose com padrão de malformações como edema facial e encurtamento axial e cauda laterodorsal em girinos (ALLRAN; KARASOV, 2001). O glifosato com exposições de concentração que variaram de 5 a 20 mg/L podem induzir malformações em embriões e defeitos neurais (BONFANTI *et al.*, 2018). O carbosulfano,

também se mostrou responsável pela natação anormal de girinos com concentrações que variam de 0,6 a 50 mg/L (SAMARAKOON; PATHIRATNE, 2017).

Papis *et al.* (2006) demonstraram que o fungicida triadimefon em concentrações variando de 1,96 a 250 μ M, expõe alterações branquiais, bucais e mudanças na pigmentação dos girinos. Igualmente, Lenkowski *et al.*, (2010) relacionou a exposição à atrazina e ao triadimefon (21,88 e 51,05 mg/L) a malformação intestinal e edemas em girinos.

Consoante, destaca-se que a dispersão de agroquímicos na natureza podem resultar em misturas complexas com outros poluentes já inclusos nos agroecossistemas, com efeitos biológicos letais e subletais, resultando em atraso no desenvolvimento e anormalidades morfológicas (BOCCIONI *et al.*, 2021; BOKONY *et al.*, 2020; GOESSENS *et al.*, 2022).

Com base nessas premissas, as análises dos parâmetros de qualidade de água devem ser expandidas, uma vez que a grande maioria das pesquisas apresentam abordagens direcionadas as análises de dados em laboratório, utilizando ensaios ecotoxicológicos com concentrações ambientalmente relevantes para idealizar o melhor ambiente aquático para os anfíbios e, apenas, uma pequena fração representa os estudos *in situ* (Tabela 1).

Ambos são importantes para subsidiar as avaliações. Todavia, os estudos à campo permitem o entendimento realista das interações de múltiplos estressores devido ao fluxo de contaminantes e à dinâmica de exposição e conseqüentemente melhor gerenciamento dos resultados (ASCOLI-MORRETE *et al.*, 2022; CRANE *et al.*, 2007).

Tabela 1. Estudos *in situ* relacionados a qualidade da água e anfíbios

ESTRESSORES	IDENTIFICAÇÃO	ESTÁGIO DE VIDA	CONSEQUÊNCIAS	REFERÊNCIA
Agroquímicos	Acefato Carbosulfan Clorpirifós Deltametrina Diuron Metribuzin Pendmenthalina Tefubenzuron Triadimenol	Adultos	Bioacumulação Danos genotóxicos	Ascoli-Morrete <i>et al.</i> , 2022
Agroquímicos	Fipronil 2,4-D fertilizante vinhaça	Girinos	Mortalidade Efeitos subletais	Freitas <i>et al.</i> , 2022
Parâmetros físico-químicos	Nitrogênio inorgânico dissolvido Turbidez Amônia Ortofosfato Condutância específica	Adultos	Mortalidade	Smalling <i>et al.</i> , 2021
Parâmetros biológicos	E. coli Enterococos Coliforme totais			
Agroquímicos		Adultos	Danos genotóxicos	Şişman <i>et al.</i> , 2021
	pH Oxigênio dissolvido Condutividade Sólidos totais Salinidade	Adultos	Aumento na frequência de anormalidades nucleares	Assis <i>et al.</i> , 2021
Parâmetros físico-químicos Agroquímicos				
Parâmetros físico-químicos	Carbono orgânico total Fósforo total ORP Oxigênio dissolvido	Embriões Girinos	Crescimento e desenvolvimento	Dyck <i>et al.</i> , 2021

Agroquímicos	pH T°C Turbidez TDS Condutividade Imidacloprido Clothianidina Atrazina Glifosato Sulfato Nitrato			
Parâmetros físico-químicos	Sólidos dissolvidos totais Magnésio Cloro Sódio Sulfato	Girinos	Diminuição na abundância Desequilíbrio osmótico	Donald, 2021
Radiação UVB/UVA Agroquímicos	Ácido diclorofenoxiacético Atrazina Clomazone Clotianidina Propoxur Triclorfon Ciproconazol Picoxistrobina Trifloxistrobina	Girinos	Danos genotóxicos Danos Genotóxicos Incidência de radiação solar	Rocha <i>et al.</i> , 2020
Parâmetros físico-químicos	pH T°C			
Agroquímicos	Atrazina Fosfato Nitrato Turbidez	Girinos	Anormalidades nucleares eritrocitária Diminuição da riqueza e abundância	Borges <i>et al.</i> , 2019 Calderon <i>et al.</i> , 2019

	Coliformes Totais			
	Oxigênio dissolvido			
Agroquímicos		Girinos	Danos genotóxico	Gonçalves <i>et al.</i> , 2019
Xenobióticos		Adultos	Danos genotóxicos	Pollo <i>et al.</i> , 2019
Parâmetros físico-químicos	Derivados de petróleo	Adultos	Danos genotóxicos	Romanova <i>et al.</i> , 2019
Metais	Magânes Cobre Cromo Ferro			
Agroquímicos	Pesticidas organoclorados	Adultos	Danos genotóxicos	Cruz-Esquivel <i>et al.</i> , 2017
Agroquímicos		Girinos	Danos genotóxicos	Gonçalves <i>et al.</i> , 2017
Parâmetros físico-químicos	pH	Embriões	Risco potencial de acidificação	Serrano <i>et al.</i> , 2016
Metais	Chumbo Magânes Zinco Estrôncio Cobalto Níquel		Diminuição da população	
Parâmetros físico-químicos	Fosfato	Embriões	Mortalidade	Babini <i>et al.</i> , 2016
	Nitrato	Girinos	Anormalidades morfológicas totais	
	Flúor		Aumento na frequência de anormalidades nucleares	
	pH			
	Condutividade			
	Salinidade			
	Sólidos dissolvidos totais			
	Turbidez			
Parâmetros físico-químicos	Temperatura	Girinos	Danos genotóxicos	Pollo <i>et al.</i> , 2016
	pH	Adultos		
	Oxigênio dissolvido			
	Condutividade			
	Sólidos dissolvidos totais			
	Salinidade			

	Fluor Sódio Cloro			
Metais	Cobre Níquel Chumbo Zinco Cádmio	Girinos	Diminuição na abundancia	Ficken <i>et al.</i> , 2014
Parâmetros físico-químicos	Condutividade eletrica			
Agroquímicos	Ortofosfato			
Metais	Níquel	Adultos	Anormalidades nucleares eritrocitárias	Gonçalves <i>et al.</i> , 2012
Parâmetros físico-químicos	Sulfato pH Oxigênio dissolvido Condutividade Cloreto	Embriões Girinos	Sobrevivência embrionária	McKibbin <i>et al.</i> , 2008
Metais	Alumínio Ferro Cádmio Cobre			
Agroquímicos	Ortofosfato Heptacloro Heptacloro epóxido Sulfato de endosulfan Endosulfan II	Girinos	Mortalidade Danos genotóxicos Anormalidades nucleares	Peltzer <i>et al.</i> , 2008
Parâmetros físico-químicos	Nitrato Oxigênio dissolvido Turbidez			
Agroquímicos		Girinos	Sobrevivência	Loman; Lardner, 2006
Parâmetros físico-químicos	Nitrato Nitrito pH			

	Condutividade Oxigênio dissolvido			
Parâmetros físico-químicos		Adultos	Danos genotóxicos	Matson <i>et al.</i> , 2005
Metais	Cromo Cobre Cádmio Níquel	Pós-metamorfos	Desenvolvimento Sobrevivência	McDaniel <i>et al.</i> , 2004
Parâmetros físico-químicos	Nitrogenio total Amônia Sólidos dissolvidos totais Turbidez			
Xenobióticos	Bifenilos policlorados Hidrocarbonetos aromáticos			
Agroquímicos				
Agroquímicos	Diclorodifenildicloroetileno Endosulfan Clorpirifós Diazinon Clordano Hexaclorocicloexano	Adulto	Acumulação tecidual	Fellers <i>et al.</i> , 2004
Parâmetros físico-químicos	Detergentes Cloreto pH Dureza Fosfato Sílica Turbidez	Girinos Adultos	Diminuição da riqueza e abundância	Brodman <i>et al.</i> , 2003

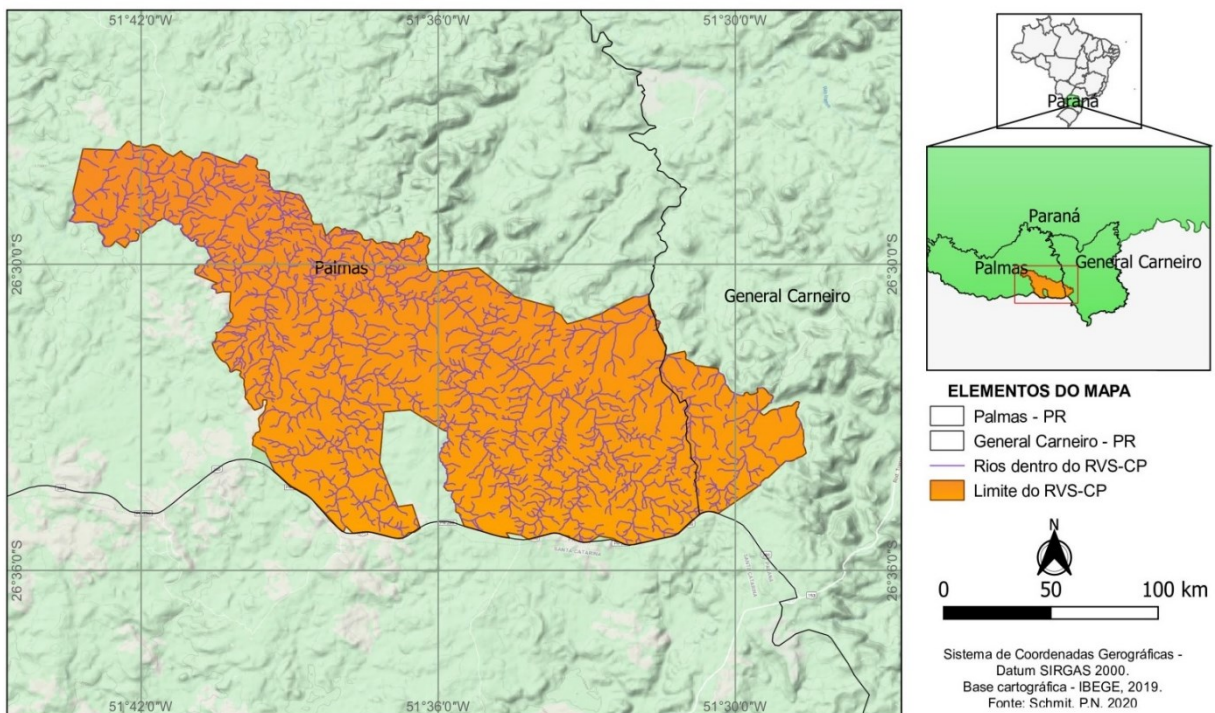
Fonte: Autoria própria (2022).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Caracterização da área de estudo

O trabalho foi desenvolvido na região da Unidade de Conservação (UC) Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP), localizado em sua maioria no município de Palmas, e uma parte menor no município de General Carneiro, ambos no Estado do Paraná (Figura 1).

Figura 1. Localização do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas



Fonte: Autoria própria (2022)

O RVS-CP foi criado em 03 de abril de 2006 por Decreto Presidencial s/n, abrangendo 16.582 hectares, com o intuito de proteger os ambientes naturais necessários à existência ou reprodução da flora e fauna residente ou migratória, especialmente os remanescentes de estepe gramíneo-lenhosa (campos nativos) de floresta ombrófila mista (mata com araucárias), as áreas de campos úmidos e várzeas que abrangem ecossistemas típicos das porções elevadas do Planalto de Palmas (ICMBIO, 2016).

Entretanto, no tocante do Decreto legislativo, o RVS-CP por força do artigo 3º não desapropriou as propriedades privadas que permaneceram dentro da UC, as quais podem executar suas atividades agropecuárias, tais como pastoreio,

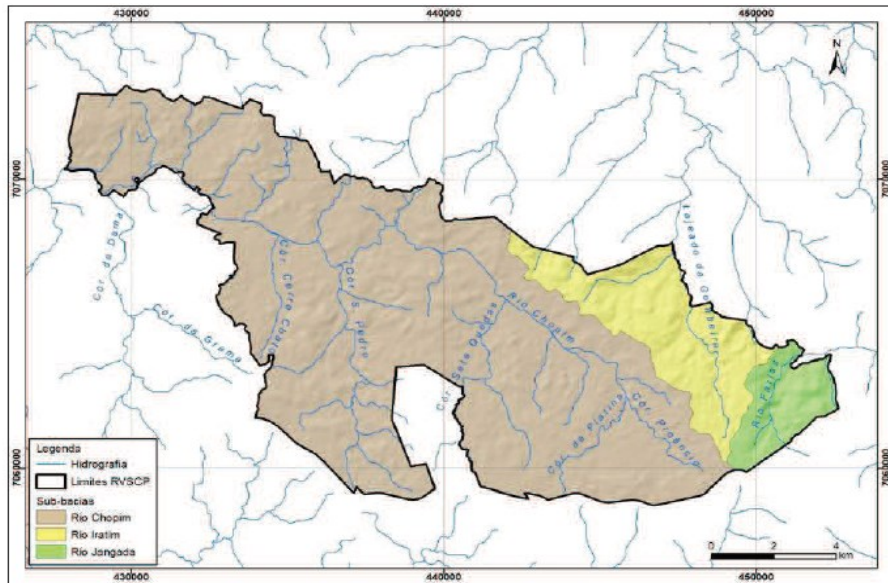
exploração da erva mate e cultivo de grãos em plantio direto, além da atividade de silvicultura, desde que haja compatibilidade entre o uso e os objetivos da Unidade, principalmente ao que concerne a adoção de técnicas que minimizem o uso de agroquímicos e disseminação de espécies exóticas em áreas com cobertura vegetal nativa.

Assim, o RVS-CP incorpora cerca de 35 estabelecimentos particulares, de grande e pequeno porte que influenciam na economia local através da atividade agropecuária, principalmente a pecuária extensiva, plantio de grãos, silvicultura e extração de erva-mate. As principais culturas comerciais são temporárias, com destaque para o milho, soja, feijão e hortaliças, já as lavouras permanentes apresentam predomínio da fruticultura (ICMBIO, 2016).

A cobertura vegetal existente no RVS-CP está incluída no bioma Mata Atlântica, com formações de campos associados com capões de Floresta Ombrófila Mista com predominância de *Araucaria angustifolia* (MAACK, 2002). A fisionomia campestre é constituída por estepe *stricto sensu*, com vegetação herbáceo-arbustiva representando os campos limpos, estepe higrófila, em locais onde há surgência de água e predomínio de herbáceas, refúgios vegetacionais rupestres, correspondendo a vegetação diretamente associada aos afloramentos de arenito, formações pioneiras de influência fluvial, de fisionomia herbáceo arbustiva, constituindo basicamente os brejos e várzeas (ICMBIO, 2016; KLEIN, 1984). Entretanto, a vertente dos ambientes antropizados permanecem presentes na fisionomia campestre da UC, com predomínio de árvores frutíferas e ornamentais principalmente próximo as residências, campos circundados com gado ou ovelhas, agricultura e fruticultura, com culturas de maçã, aveia, milho, batata, soja, azevém e trevo, e ainda a silvicultura, com plantios de *Pinus* e *Eucalyptus* (ICMBIO, 2016).

A área do RVS-CP inclui parte de três importantes sub-bacias hidrográficas do Rio Chopim, Rio Iratim e Rio Jangada, todos afluentes da margem esquerda do Rio Iguaçu. A sub-bacia do Rio Chopim, representa 81,4% dentro da Unidade de Conservação com 135 km², a sub-bacia do Rio Iratim abrange uma área de 22,17 km², o que constitui 13,4% do RVS-CP e a sub-bacia do Rio Jangada envolve uma área de 8,65 km², correspondente a 5,2% do total do RVS-CP (Figura 2) (ICMBIO, 2016).

Figura 2. Principais Sub-bacias no RVS-CP



Fonte: STCP Engenharia de Projetos Ltda., 2012. ICMBIO Plano de Manejo Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas, 2016.

O clima predominante dos Campos de Palmas, que compõe o RVS-CP é temperado chuvoso e moderadamente quente, úmido em todas as estações do ano, com temperatura média anual de 16,3 °C, com média máxima de 26,4°C em janeiro e média mínima de 5°C á 6°C em julho, sendo considerada uma das regiões mais frias do Estado do Paraná (ICMBIO, 2016; NITSCHKE *et al.*, 2019).

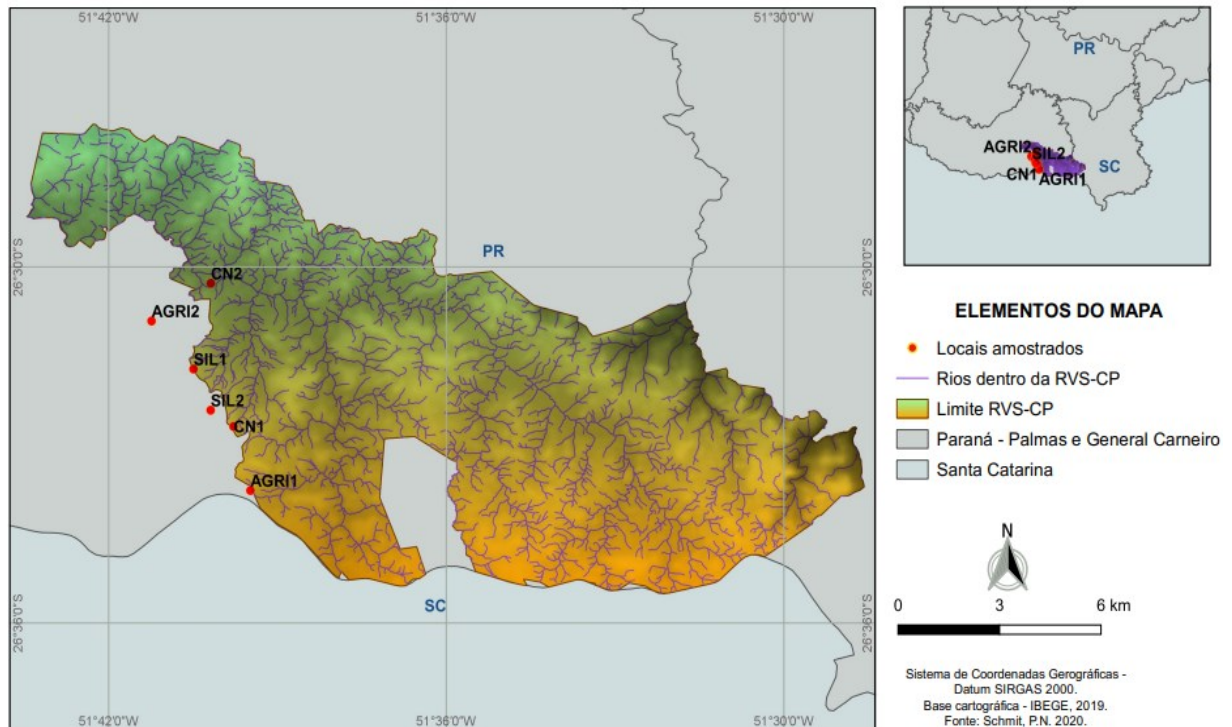
A formação geológica é composta essencialmente por basaltos, com pouca diferenciação em sua composição, considerada geologicamente estável, salvo a eventual existência de depósitos coluvionares em trechos dos sopés das elevações e zonas heterogêneas de disjunção horizontal e vertical (ICMBIO, 2016).

O contexto geomorfológico, o relevo é caracterizado como suave-ondulado a ondulado, sendo comum a presença de estruturas tabulares que constituem morros residuais (LIMA, 2014). Os tipos de solo predominantes são Neossolos Litólicos e Cambissolos, entretanto verifica-se também a presença de paleossolos húmicos enterrados e camadas de sedimentos coluviais, colúvio-aluviais e aluviais (MINEROPAR, 2005; PAISANI *et al.*, 2009; PAISANI *et al.*, 2012).

5.1.2 Locais amostrados

Os locais amostrados dentro da unidade de conservação RVS-CP compreendem duas áreas de campo natural nativo (CN1 e CN2), duas áreas de silvicultura de *Pinus* (SIL1 e SIL2) e uma área de agricultura (AGRI1), além de uma área de cultivo agrícola no entorno do RVS-CP (AGRI2) (Figura 3).

Figura 3. Localização dos pontos de amostragem na região do RVS-CP



Fonte: Autoria própria (2022).

A área CN1 (26°32'41.21"S 51°39'46.85"W) é formada por campo hidrófilo, correspondendo à área alagada permanentemente com comunidades de macrófitas aquáticas (Tabela 2). A vegetação campestre natural é constituída por capão de mata nativa em uma das laterais e estepe gramíneo-lenhosa em outra (Figura 4-a). O local amostrado sofre interferências relacionadas a pastoreio de ovelhas. CN2 (26°30'16.43"S 51°40'11.00"W) constitui-se por campo hidrófilo, com área permanentemente alagada e comunidades de macrófitas aquáticas. A estrutura vegetacional é formada por campo natural campestre e ocorrência de gramíneas exóticas principalmente capim-annoni (*Eragrostis plana*), sendo a comunidade vegetal mais rala, devido ao uso intensivo de pastoreio de ovelhas. Além disso, o local sofre influência da proximidade com residências e estrada rural (Figura 4-b).

No local amostrado SIL1 (26°31'43.15"S 51°40'29.48"W) a vegetação dessa formação corresponde à floresta de *Pinus* constituído pela presença de poças permanentemente alagadas e gramíneas. O local sofre intervenção esporádica de veículos por tratar-se de estrada utilizadas para o transporte de *Pinus* (Figura 4-c). SIL2 (26°32'24.79"S 51°40'11.20"W) encontra-se no estrato inferior da floresta de *Pinus*, com área temporariamente alagada e presença de vegetação composta por gramíneas (Figura 4-d).

No sítio de estudo AGRI1 (26°33'45.96"S 51°39'28.83"W) caracteriza-se por predomínio de culturas de feijão e soja, com fragmentos de vegetação de gramíneas cespitosas, principalmente *Rhynchospora marisculus* (Cyperaceae) comuns na paisagem campestre da região e área permanentemente alagada (Figura 4-e). AGRI2 (26°30'54.60"S 51°41'14.24"W) encontra-se fora RVS-CP, situando-se na região de divisa entre a Unidade de Conservação. Entremendo o plantio agrícola de feijão e soja encontra-se o campo úmido com domínio de *Rhynchospora marisculus* (Cyperaceae) (Figura 4-f).

Tabela 2. Descrição e localização dos pontos de coleta

<u>Pontos de Coleta</u>	<u>Vegetação</u>	<u>Corpo d'água</u>	<u>Interferência</u>	<u>Coordenadas geográficas</u>
CN1	Capão de mata nativa e estepe gramíneo-lenhosa	Área alagada permanentemente com comunidades de macrófitas aquáticas	Pastoreio	26°32'41.21"S 51°39'46.85"W
CN2	Vegetação campestre e vegetação exótica	Área alagada permanentemente com comunidades de macrófitas aquáticas	Pastoreio, residências e estrada rural	26°30'16.43"S 51°40'11.00"W
SIL1	Floresta de <i>Pinus</i>	Poças permanentemente alagadas e gramíneas	Plantio de <i>Pinus</i> e via de transporte	26°31'43.15"S 51°40'29.48"W
SIL2	Estrato inferior floresta de <i>Pinus</i>	Área temporariamente alagada e presença de vegetação composta por gramíneas	Plantio de <i>Pinus</i>	26°32'24.79"S 51°40'11.20"W
AGRI1	Predomínio de culturas de feijão e soja com vegetação campestre	Áreas temporariamente alagadas com macrófitas aquáticas	Plantio agrícola de feijão e soja	26°33'45.96"S 51°39'28.83"W
AGRI2	Predomínio de culturas de feijão e soja com vegetação campestre	Áreas temporariamente alagadas com macrófitas aquáticas	Plantio agrícola de feijão e soja	26°30'54.60"S 51°41'14.24"W

Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 4. Locais amostrados na região da Unidade de Conservação RVS-CP.



A: CN1, B: CN2, C: SIL1, D: SIL 2, E: AGRI 1, F: AGRI 2.

Fonte: Autoria própria (2022).

5.2 Animais ensaio

As espécies selecionadas para o estudo foram *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) (Figura 5-a) *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) e *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892), por tratar-se de espécies abundantes nos banhados e corpos de águas temporários na região da Unidade de Conservação

RVS-CP.

Figura 5. Espécie *Physalaemus cuvieri* amostrada (a) e ninho de espuma em pegada de gado (b).



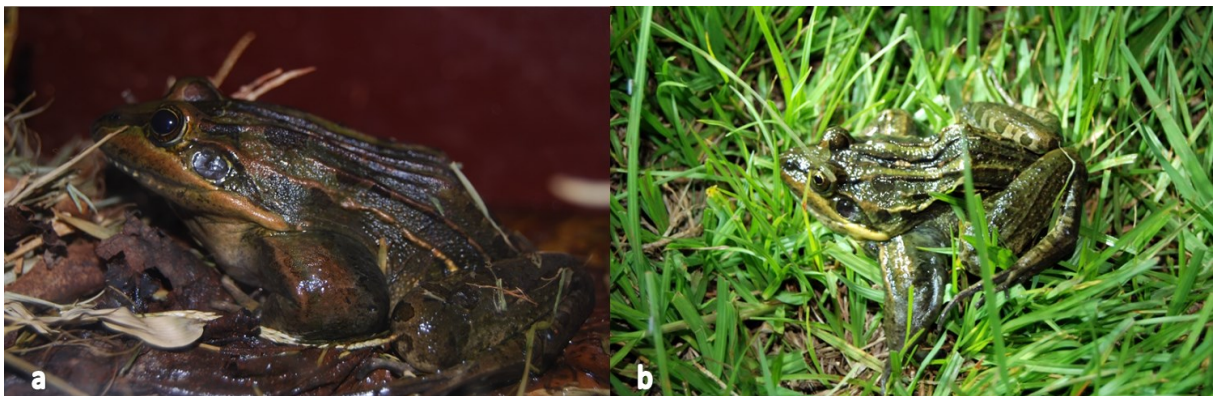
Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 6. Espécie *Dendropsophus minutus* amostrada (a) e vocalização em arbusto (b)



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 7. Espécie *Leptodactylus luctator* amostrada (a) e registro de *L. luctator* em área aberta (b).



Fonte: Autoria própria (2022)

5.2.1 *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826)

Esse anuro pode ser encontrado em uma ampla variedade de habitats de área aberta, utilizando preferencialmente poças provenientes de pegadas do gado (Figura 5-b). A aproximação de corpos de águas somente ocorre para a reprodução, após esse intervalo podem ser encontrados longe de cursos d'água mesmo em períodos de secas. Sua atividade reprodutiva inicia-se no final de setembro e estende-se até março (BASTOS *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2016; FROST, 2022; KWET *et al.*, 2010).

Os exemplares da espécie possuem coloração dorsal variável, usualmente tonalidades fracas de castanho ou cinza com manchas e linhas escuras. As glândulas cutâneas apresentam uma grande mancha circular escura, com centro claro entre os ombros. Lateralmente possuem uma larga faixa escura, sendo o ventre branco, manchado de escuro no peito e garganta (Figura 5-a). Possuem pouco dimorfismo sexual em relação ao comprimento CRC (comprimento rosto cloacal) sendo que em geral as fêmeas com tamanho entre 28 a 32 mm, e os machos 24 a 31 mm. O principal caractere dimórfico da espécie é a garganta negra dos machos frequentemente com uma linha mediana branca (KWET *et al.*, 2010).

Physalaemus cuvieri possui atividade predominantemente noturna, durante o período reprodutivo a espécie é estimulada por fatores ambientais, principalmente pela temperatura e precipitação. Seu coaxar típico lembra o latido de um cão, com notas ligeiramente repetitivas (KWET *et al.*, 2010).

O comportamento reprodutivo da espécie é caracterizado pela atividade de vocalização dos machos flutuando na água e movimentação de fêmeas para a seleção do macho. Após a escolha do macho ocorre o amplexo e a postura dos ovos em ninhos de espuma de 5 a 6 centímetros de diâmetro (Figura 5-b), presos às gramíneas da margem da água. A desova pode conter de 400 a 700 ovócitos brancos (KWET *et al.*, 2010).

5.2.2 *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872)

A espécie *Dendropsophus minutus* (Figura 6-a) é popularmente conhecida como pererequinha-do-brejo, caracteriza-se como uma espécie pequena com 21 a 25 mm (machos) e 23 a 28 mm (fêmeas) de comprimento rostro-cloacal (CRC),

possui coloração castanho-alaranjado, castanho ou bege, com duas listras longitudinais paralelas e escuras. Geralmente possuem o ventre esbranquiçado com saco vocal amarelo nos machos e nas fêmeas essa região é esbranquiçada (RIBEIRO *et al.*, 2005; KWET *et al.*, 2010).

A espécie é amplamente distribuída na América do Sul, durante a estação reprodutiva é comum em áreas abertas vocalizando sobre gramíneas ou arbustos próximos aos corpos d'água (Figura 6-b). O amplexo é axilar e os ovos são depositados em pequenos grupos presos a vegetação em média com 150 a 350 ovócitos (FROST, 2022; KWET *et al.*, 2010; POMBAL & HADDAD, 2005).

5.2.3 *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892)

Anuro de grande porte (Figura 7-a), os machos adultos são maiores que as fêmeas com tamanho variado entre 72,7 à 121,6 mm e fêmeas entre 73,9 à 115,8 mm CRC. Possuem oito pregas dorsolaterais proeminentes e manchas oceladas ao longo da região dorsal, sendo a coloração do dorso, flancos e membros em geral em tons de marrom claro com manchas marrom-escuras e superfície posterior da coxa amarela com manchas marrons maculadas no fundo. Membrana timpânica cinzenta e garganta pigmentada em cinza claro. Os machos de *L. luctator* são robustos com membros anteriores fortemente desenvolvidos e um par de espinhos negros no polegar (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

Entre o complexo grupo pertencente à *Leptodactylus latrans*, *L. luctator* possui uma ampla distribuição com registros no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia. Habitam áreas abertas (Figura 7-b) e frequentemente são encontrados dentro da água, em açudes, pequenas lagoas ou áreas inundadas. As desovas são depositadas em ninhos de espumas na superfície da água e as fêmeas apresentam cuidado parental aos ovos por várias semanas (KWET *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2020).

5.2.4 Coleta dos exemplares da espécie

A procura dos exemplares foi realizada durante o período de novembro de 2019 a fevereiro de 2021, por método de levantamento em sítio de reprodução durante o período noturno de vocalização das espécies. Para complementar o

levantamento realizou-se busca ativa das espécies em corpos de águas temporários, poças provenientes de pegadas do gado, arbustos no entorno das áreas já definidas previamente. Para cada ambiente amostrado (CN1, CN2, SIL1, SIL2, AGRI1 e AGRI2) foram coletados entre 2 a 25 indivíduos.

Os exemplares visualizados foram coletados manualmente com o auxílio de lanterna, de acordo com o método de animal focal e transportados em sacos plásticos umedecidos contendo vegetação local para evitar ressecamento.

O estudo proposto possui licença nº 74269-1, emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) e autorização do comitê de ética da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus de Francisco Beltrão (UTFPR/FB), parecer sob o nº 2018-42/2019 - CEUA.

5.3 Teste do micronúcleo

O ensaio do micronúcleo foi realizado conforme metodologia descrita por Gauthier *et al.* (2004) e Gonçalves *et al.* (2019), com algumas modificações. Os anuros adultos foram anestesiados por aproximadamente 2 minutos em solução de benzocaína a 5%. Após a verificação do processo de sedação colocados em outro recipiente com a mesma solução anestésica para o aprofundamento da sedação por, no mínimo, mais 30 minutos até a morte. Posteriormente a confirmação da morte, foram coletadas amostras de sangue por punção direta do coração ou pelo rompimento do fígado.

Os animais foram então fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e depositados na coleção zoológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus de Francisco Beltrão (UTFPR/FB) (CFMV, RESOLUÇÃO Nº 1000/2012).

Do sangue foram produzidas pelo menos cinco lâminas por esfregaço. As lâminas foram fixadas em metanol por 1 hora e secas à temperatura ambiente. Em seguida a esta secagem, a fixação foi feita com imersão das lâminas em álcool 96% (etanol) por 30 minutos, secas à temperatura ambiente por 12 horas, e coradas com Giemsa 20% diluído em tampão fosfato, com pH 6,8, por 20 minutos ao abrigo da

luz. Após a secagem, as lâminas foram acondicionadas e guardadas em caixas próprias, para serem analisadas subsequentemente.

A frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares (células segmentadas, células binucleadas, células com broto e células reniforme) foram determinadas em 2000 eritrócitos para cada indivíduo usando o microscópio óptico de luz, com aumento da objetiva de imersão (100 X). Após, calculado o número médio de micronúcleos, o percentual de micronúcleos, o número médio de alterações nucleares e o percentual de alterações nucleares para cada animal coletado.

A análise estatística foi realizada pelo teste de normalidade e variância ANOVA, seguido do teste de comparação de médias de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$), utilizando o Programa *Action Stat*.

5.4 Coleta e caracterização da água e sedimentos

5.4.1 Coleta da água e sedimentos

As amostras de água e sedimento foram coletadas em todos os ambientes amostrados (CN1, CN2, SIL1, SIL2, AGR11 e AGR12) nos quais ocorreu a captura das espécies, seguindo as orientações descritas pelas NBR 9.897 e 9.898 (ABNT, 1987), que tratam do planejamento de amostragem bem como das técnicas de preservação e amostragem, respectivamente, abrangendo as amostras de água e sedimentos.

5.4.2 Caracterização da água

Os parâmetros da água, a saber: temperatura em Celsius ($^{\circ}\text{C}$), potencial hidrogeniônico (pH), potencial de oxidação-redução em mili-Volts (ORP), condutividade elétrica em mili-Siemens por centímetro (mS/cm), turbidez em unidades nefelométricas de turbidez (NTU); porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD), oxigênio dissolvido em miligramas por litro (mg/L), sólidos dissolvidos totais (TDS); foram determinados em campo com uma sonda multiparamétrica, marca HORIBA, modelo U-50.

Já os parâmetros Demanda Química de Oxigênio (DQO), segundo a norma SMWW 23a, edição 2017, método 5210B e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), com base no SMWW 23a, edição 2017, método 5220D, foram determinados no Laboratório de Águas LGQ em Francisco Beltrão.

5.4.3 Caracterização do sedimento

As amostras de sedimento, acondicionadas em embalagens esterilizadas e preservadas em temperatura menor que 0 °C, foram remetidas ao Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), para a análise dos agroquímicos presentes pela técnica de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS), segundo métodos validados no LARP-UFSM (Método multiresíduo contemplando cerca de 200 agroquímicos).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Parâmetros físico-químicos

Os locais amostrados CN1, CN2, SIL1, SIL2 e a área agrícola AGR2 (Tabela 3) apresentaram durante o estudo diferentes níveis pluviais, sendo na maior parte apenas uma lâmina de água em virtude da estiagem que assolou a região com temporadas sem vestígios de água. Dados do sistema de informações hidrológicas revelam a diferença de precipitação anual de 528,7 mm entre o ano de 2019 (1755,0 mm) para 2020 (1226,3 mm), resultando na captura de exemplares abaixo do esperado para a estação reprodutiva das espécies (AGUASPARANÁ, 2021). As características físico-químicas como condutividade (SI), pH, temperatura (T°C), potencial de oxidação-redução (ORP), turbidez (NTU), oxigênio dissolvido (OD), sólidos dissolvidos totais (TDS), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) para cada sítio amostrado estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água obtidos entre novembro/2019 a fevereiro/2021

Ponto de Coleta	Data da coleta	Nº de indivíduos	T°C	pH	ORP	SI	NTU	OD	%OD	TDS	DBO	DQO
CN1	02/11/19	8	25,6	9,4	-104	0,024	59,7	8,68	107,9	0,015	11,3	19,83
	25/01/20	1	22,75	5,46	66	0,017	0	2,73	32,5	0,011	8,55	19,8
	24/02/21	2	20,43	4,56	125	0,006	0	3,68	41,9	0,008	5,24	10,91
CN2	02/11/19	11	21,67	6,01	111	0,019	644	6,38	74,4	0,013	36,38	67,37
	11/01/21	5	27,36	6,3	97	0,035	40,2	7,05	90	0,023	15,06	27,88
	24/02/21	9	20,95	5,14	77	0,039	0	2,46	28,3	0,025	7,31	16,25
SIL1	02/11/19	6	22,16	6,34	201	0,022	459	6,83	80,2	0,014	24,97	45,41
	24/02/21	1	22,98	6,83	110	0,017	15,8	4,55	54,2	0,011	16,8	34,29
SIL2	24/02/21	2	19,54	5,5	142	0,015	414	6,44	72,3	0,01	11,93	22,09
AGRI1	24/02/21	4	22,11	4,34	249	0,017	131	4,44	52,1	0,011	13,01	28,28
AGRI2	20/02/20	1	25,36	5,78	-42	0,069	0,0	1,01	12,5	0,045	2,85	4,2
	24/02/21	16	23,28	8,56	18	0,062	35,2	11,13	133,3	0,04	17,72	38,52

Temperatura em Celsius (T °C), Potencial hidrogeniônico (pH), Potencial de oxidação-redução em mili-Volts (ORP mV), condutividade elétrica em mili-Siemens por centímetro (mS/cm), turbidez em unidades nefelométricas de turbidez (NTU); oxigênio dissolvido em miligramas por litro (mg/L), porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD), sólidos dissolvidos totais (TDS), em gramas por litro (g/L)

Fonte: Autoria própria (2022)

Os valores encontrados para o parâmetro potencial hidrogeniônico nos ambientes CN1 (02/11/2019) e AGR12 (24/02/2021) apresentaram-se mais básicos, demonstrando reações de íons de carbonato e bicarbonatos com a água, que elevam os valores de pH para a faixa alcalina, pois aumentam a concentração hidroxiniônica, principalmente pela presença de metais alcalinos e alcalino-terrosos (APHA/AWWA/WEF, 2018). Em contraponto CN1 (25/01/2020 e 24/02/2021), CN2, SIL2, AGR11 (24/02/2021) e AGR12 (20/02/2020) indicaram pH ácido, sugerindo maior quantidade de matéria orgânica disponível (ESTEVES, 1998).

Os estudos com anfíbios sugerem que o fator pH, entre 6 e 9, é compatível para a sobrevivência das espécies, sendo a bandagem de 6 a 7 ideal para o desenvolvimento biológico (GAUTHIER *et al.*, 2004; FICKEN, BYRNE, 2013; SHAIKH *et al.*, 2016, PELUSSO *et al.*, 2019; PELUSSO *et al.*, 2020). Nesse aspecto, valores próximos à neutralidade foram observados apenas em CN2 (02/11/2019 e 11/01/2021) e SIL1 (02/11/2019 e 24/02/2021).

Os valores para oxigênio dissolvido (OD) apresentaram algumas oscilações entre as datas de coleta, porém mantiveram-se acima do relatado como crítico por outros autores, com exceção do sítio AGR12 (20/02/2020) que apresentou nível extremamente baixo (1,01 mg/L). Os registros na literatura denotam que a faixa de oxigênio dissolvido para anfíbios pode transmutar entre espécies e os traços de história de vida, contudo níveis abaixo de <2 mg/L, são considerados críticos e prejudiciais para o desenvolvimento e sobrevivência (BABINI *et al.*, 2018; BERNAL *et al.*, 2011; CALDERON *et al.*, 2019; PELUSO *et al.*, 2019; MANN; BIDWELL, 2001; SCHMUTZER *et al.*, 2008).

Avaliando esse parâmetro, os valores mais baixos, porém não considerados críticos, podem estar associados à característica vertical dos corpos de água estudados, que se apresentaram mais rasos, devido ao período de estiagem, diminuindo consideravelmente a proporção de água. Segundo Carpenter *et al.* (2011) o aumento da temperatura faz com que ocorra a queda da concentração de oxigênio que pode ser dissolvido em águas superficiais e conseqüentemente diminui a disponibilidade de oxigênio para a respiração por organismos e processamento de matéria orgânica e poluentes, além de interferir na disponibilidade de habitat para

organismos aquáticos. Por outro lado, o valor crítico registrado para AGRI2 pode estar correlacionado a altas concentrações de elementos como fósforo e nitrogênio comumente associado ao escoamento agrícola e a presença de macrófitas aquáticas emersas (*Typha*, gramíneas, entre outras), que produzem grande quantidade de biomassa, especialmente no período de seca (BABINI *et al.*, 2018; ESTEVES, 1998; PELUSO *et al.*, 2019).

O parâmetro temperatura da água foi associado aos dias de coleta e horários, mantendo-se entre 27,36°C e 19,54°C, sem distinção entre as áreas de fisionomia campestre, agrícola ou em áreas de silvicultura que possuem floresta de *Pinus*. Estudos relatam o aumento da temperatura vinculado à ausência de cobertura vegetal e a áreas agrícolas, no entanto não foi registrada essa interferência (ASSIS *et al.*, 2021; DYCK *et al.*, 2021; KARRAKER *et al.*, 2008; NIMET *et al.*, 2020; PIÑON-FLORES *et al.*, 2021).

Os valores registrados para turbidez foram superiores em CN2 (644 NTU em 02/11/2019), SIL1 (459 NTU em 02/11/2019) e SIL2 (414 NTU em 24/02/2021). Os potenciais efeitos relacionados à turbidez não são claramente distintos, essencialmente porque os anfíbios habitam ambientes lênticos frequentemente turvos, apesar disso, estudos vêm operando esse parâmetro como um indicador de degradação do habitat, vez que o aumento da sedimentação está relacionado diretamente com a atividade antrópica, como por exemplo, pastagem e agricultura, resultando em danos aos habitats naturais (CALDERON *et al.*, 2019; VEGA *et al.*, 2013; SCHMUTZER *et al.*, 2008; SMALLING *et al.*, 2021).

Destarte, registra-se que o CN1 e CN2 apresentam interferências relacionadas a pastoreio de ovelha, com intensa movimentação desses animais no local, justificando a turbidez elevada. Schmutzer *et al.* (2008) em estudo dos impactos do gado em girinos, relataram que o acesso do rebanho às lagoas aumentou a turbidez da água em até 3,5 vezes mais do que em áreas sem acesso, pela movimentação e adição de matéria orgânica durante a defecação. Já SIL1, encontra-se em via de transporte de *Pinus*, estando igualmente sujeita a movimentação do sedimento. Somado a esses fatores, deve-se considerar que CN1, CN2 e AGRI1 são ambientes lênticos, com quantidades de nutrientes dissolvidos e de matéria orgânica e inorgânica.

Os valores de sólidos dissolvidos totais (TDS) não apresentaram altos níveis e estão dentro dos valores aceitáveis para anfíbios com base em estudos que registraram entre 1,818 g/L e 0,414 g/L (BABINI *et al.*, 2016; DONALD, 2021; SHAIKH *et al.*, 2016).

O potencial de oxirredução (ORP) mede a capacidade de oxidação ou redução de uma substância, com transferência de elétrons (BROWN *et al.*, 2005). Nos corpos d'água amostrados, a condutividade do potencial de oxidação-redução (ORP), apresentou flutuações de valores nos mesmos pontos de coleta em períodos diferentes, com resultados negativos em CN1 (-104 mV em 02/11/2019) e AGR12 (-42 mV em 20/02/2020), representando condições redutoras, que promovem processos anaeróbios, tais como a redução de sulfato, acetogênese e metanogênese. Em contra partida, valores elevados de potencial redox (ORP +100 a +249 mV) foram dominantes na maior parte das coletas, e estão associados a um ambiente oxidante que promove processos aeróbios (FAULWETTER *et al.*, 2009; MINA *et al.*, 2018; VON SPERLING, 2005). Segundo Avila *et al.* (2013), o potencial redox mais elevado pode favorecer à eliminação de poluentes convencionais e de microcontaminantes emergentes.

Os resultados obtidos para o parâmetro condutividade foram considerados baixos, estando em concordância com os indicativos de outras pesquisas. De diversas referências, ressalta-se que altas concentrações de íons ($3000 \mu\text{Scm}^{-1}$) podem afetar o comportamento, crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos anfíbios, sobretudo quando associado a turbidez, sólidos dissolvidos, metais ou elevada carga de nutrientes pois amentam a condutividade elétrica. Contudo, essa associação não foi observada no estudo, sendo o menor valor para condutividade 0,006 mS/cm e o maior 0,069 mS/cm (CARDOSO *et al.*, 2018; CHAMBERS 2011; DONALD, 2021; HOME; DUNSON, 1995; JONES *et al.*, 2015; KARRAKER *et al.*; 2008; LANDI *et al.*, 2012; PIÑON-FLORES, 2021; SMITH *et al.*, 2007).

Os valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) oscilaram entre as datas de coletas, sendo níveis mais altos observados em SIL1 (02/11/2019 e 24/02/2021), CN2 (02/11/2019), AGR2 (24/02/2021). Os resultados para DQO e DBO apresentaram uma relação inversa, com índices mais baixos de DBO, pois tal parâmetro mede apenas a fração

biodegradável. Houve relação entre DBO, DQO e turbidez nos sítios CN2 e SIL1 (02/11/2019), com concentrações mais elevadas desses parâmetros, sinalizando sua relação com a matéria orgânica disponível, menor transparência e cor da água (PELUSO *et al.*, 2020a; VEGA, *et al.*, 2013; MULHOLLAND *et al.*, 2008).

Dos pontos de coleta estudados, a ocorrência de agroquímicos foi registrada exclusivamente em AGR1, com identificação de 8 diferentes princípios ativos na amostra do sedimento, entre eles um herbicida (Atrazina), cinco fungicidas (Azoxistrobina, Carbendazim, Epoxiconazol, Flutotanol, Piraclostrobina) e dois inseticidas (Clorpirifós-etílico, Imidacloprido) (Tabela 4).

Tabela 4. Resíduos de agroquímicos (mg Kg⁻¹) identificados nos sedimentos.

Compostos	CN1	CN2	SIL1	SIL2	AGRI1	AGRI2
Atrazina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.
Azoxistrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,027	n.d.
Carbendazim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,023	n.d.
Clorpirifós-etílico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,011	n.d.
Epoxiconazol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,023	n.d.
Flutotanol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.
Imidacloprido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,053	n.d.
Piraclostrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,011	n.d.

n.d. – não detectado, < LOQ: composto presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método.

Fonte: Autoria própria (2022)

O inseticida Imidacloprido apresentou maior valor registrado (0,053 mg Kg⁻¹), os demais agroquímicos apontaram concentrações mais baixas (Azoxistrobina, Carbendazim, Clorpirifós-etílico, Epoxiconazol, Piraclostrobina) ou não quantificadas (Atrazina, Flutotanol).

O imidacloprido (C₉H₁₀ClN₅O₂) é um inseticida sistêmico, que afeta o sistema nervoso central, derivado da nicotina pertencente a um grupo de pesticidas conhecidos como neonicotinóides, (ARCAUTE *et al.*, 2014; MILES *et al.*, 2017; PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2014). A concentração encontrada foi extremamente tênue, contudo, recentes pesquisas têm levantado a superveniente ocorrência de toxicidade em organismos não-alvo (BRADFORD *et al.*, 2018; SCHWARZ *et al.*, 2018). De fato, os registros apontam danos subletais em anfíbios, com efeitos

genotóxicos, bioacumulação no tecido neural dos anfíbios causando alteração no comportamento de forrageamento, alterações morfológicas com perda de massa corporal, percepção e a função cognitiva em girinos (CAMPBELL *et al.*, 2022; FENG *et al.*, 2004; LEE-JENKINS; ROBINSON, 2018; SAMOJEDEN *et al.*, 2022; SWEENEY *et al.*, 2021).

Nada obstante, devemos considerar que apesar da baixa concentração de agroquímicos presentes no substrato AGRI1 e totalmente ausente em AGRI2, os mesmos estão dispersos no ecossistema agrícola, seja por meio residual em pragas que fazem parte da cadeia alimentar dos anfíbios, vegetais ou ambientes aquáticos (ADAMS; BRÜHL, 2020; FERNANDEZ-ALBA *et al.*, 1996; FRENICH *et al.*, 2000; KO *et al.*, 2014; TEGENAWA *et al.*, 2019; ZHANG, 2020). Por essa razão, mesmo sem a existência de valores considerados preocupantes, em uma perspectiva abstrata, revela-se prudente considerar a exposição residual e a unificação com outros contaminantes biodisponíveis que podem sinergizar ou antagonizar a toxicidade (BLAUSTEIN *et al.*, 2011; BOCCIONI *et al.*, 2021; BOUALIT *et al.*, 2022; PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2014).

Consoante, as áreas amostradas encontram-se próximas, com distância máxima de 6,5 km, considerando-se o primeiro ponto, AGRI1, ao último sítio, CN2. Face a essa distribuição geográfica dos locais de estudo, cabe ponderar a dispersão dos agroquímicos por transporte atmosférico com efeito deriva em áreas não cultivadas. Tal possibilidade é justificável pelas condições climáticas da região, a saber, temperaturas mais amenas (média anual de 16,3 °C) e fortes ventos que favorecem inclusive a produtividade energética por meio das usinas eólicas presente no território de Palmas.

Os resíduos dos agroquímicos não ficam restritos ao local de aplicação, seu deslocamento em áreas circundantes ocorre por movimento no ar, evaporação de gotículas e volatilização durante a aplicação (DENEER, 2000; EPPLÉ *et al.*, 2002; FOCUS, 2008). De acordo com Bish *et al.* (2020), a velocidade do vento resulta em condições favoráveis para dispersão e diluição de gotículas ou finos suspensos no ar no momento da aplicação e o desenvolvimento da massa de ar frio está relacionado a dispersão de agroquímicos a vários quilômetros de distância do alvo

original, pois as gotículas suspensas viajam na massa de ar estável como parte de um sistema de drenagem de ar frio.

Nesse sentido, Cech *et al.* (2023) registraram resíduos de fungicidas e herbicidas em terras não agrícolas pela técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa em gramíneas. Zhang *et al.* (2018), em pesquisa utilizando uma estrutura de modelagem para abordar a contribuição da deriva de pulverização para as cargas totais de pesticidas em corpos d'água receptores, relataram que o escoamento superficial foi o principal caminho responsável por 76% da carga anual no riacho Orestimba, entretanto a deriva de pulverização contribuiu surpreendentemente em 24%. Bueno e Cunha (2020) investigaram os índices de riscos ambientais para exposição à deriva de aplicações terrestres de fungicidas, herbicidas e inseticidas que são utilizados na cultura da soja e denotaram que os organismos aquáticos foram os mais sensíveis à contaminação à deriva.

Várias linhas evidenciam também, que mesmo em locais remotos e montanhosos os contaminantes se deslocam das áreas agrícolas adjacentes. Fellers *et al.* (2004) em análise sobre as concentrações de resíduos de pesticidas em rãs de dois locais de montanhas, confirmaram a contaminação por agroquímicos e afirmaram que as características do lago e o posicionamento contribuíram para a passagem dos ventos oriundos de áreas agrícolas. Davidson e Kanapp (2007) alertaram que o declínio dos anfíbios tem causas multifatoriais, nada obstante o declive de espécies em locais montanhosos e afastados das ações antrópicas pode estar fortemente atribuído ao transporte atmosférico de agroquímicos.

Assim, argumenta-se que nos locais amostrados, pode haver uma interação subjetiva entre as condições climáticas da região e a dispersão de agroquímicos em outros locais da unidade de conservação RVS-CP. O comportamento ambiental dos agroquímicos são de extrema relevância para gerenciamentos dos riscos, a sua ausência no sedimento, não excluiu a sua distribuição na água, fauna e flora. Pondera-se considerar a sua solubilidade, dissipação, meia-vida de degradação e metabólito gerados. (BISH *et al.*, 2020; EMBRAPA, 2004; EPPLE *et al.*, 2002; FELLERS *et al.*, 2004).

6.2 Micronúcleos e alterações nucleares

Foram coletados 66 espécimes e avaliadas 132.000 células nas lagoas de agricultura (AGRI1 e AGRI2), silvicultura (SIL1 e SIL2) e campo nativo (CN1 e CN2), sendo: 72.000 eritrócitos de *Physalaemus cuvieri*, 56.000 eritrócitos de *Dendropsophus minutus* e 4.000 eritrócitos de *Leptodactylus luctator* (Tabela 5 e 6).

Tabela 5. Células totais analisadas observadas em 2000 eritrócitos para cada indivíduo estudado e alterações eritrocitárias nucleares encontradas.

ESPÉCIE	Número de Indivíduos	Total de células analisadas	Total de alterações nucleares encontradas				
			MN	SEG	BR	RN	BN
<i>P. cuvieri</i>	36	72.000	13	4	23	45	8
<i>D. minutus</i>	28	56.000	8	5	13	33	5
<i>L. luctator</i>	2	4.000	0	0	0	2	0
TOTAL	66	132.000	21	9	36	80	13

MN = Micronúcleo, SEG = Núcleo Segmentado; BR = Célula com broto; RN = Núcleo em forma de Rim; BN = Célula Binucleada.

Fonte: Autoria própria (2022)

Tabela 6. Locais amostrados, relação das espécies estudadas por ponto de coleta, número de células analisadas observadas em 2000 eritrócitos para cada indivíduo e alterações eritrocitárias nucleares encontradas.

Local amostrado	Coordenadas geográficas	Espécie	Número de Indivíduos	MN	SEG	BR	RN	BN
CN1	26°32'41.21"S 51°39'46.85"W	<i>P. cuvieri</i>	10	4	0	8	12	2
		<i>D. minutus</i>	1	0	0	0	5	0
CN2	26°30'16.43"S 51°40'11.00"W	<i>P. cuvieri</i>	16	7	0	3	13	2
		<i>D. minutus</i>	9	2	1	2	2	1
SIL1	26°31'43.15"S 51°40'29.48"W	<i>P. cuvieri</i>	7	2	2	11	16	3
		<i>P. cuvieri</i>	1	0	0	1	0	0
SIL2	26°32'24.79"S 51°40'11.20"W	<i>D. minutus</i>	1	0	0	1	5	0
		<i>P. cuvieri</i>	1	0	1	0	4	0
AGRI1	26°33'45.96"S 51°39'28.83"W	<i>D. minutus</i>	2	0	0	1	3	2
		<i>L. luctator</i>	1	0	0	0	1	0
		<i>P. cuvieri</i>	1	0	1	0	0	1
AGRI2	26°30'54.60"S 51°41'14.24"W	<i>D. minutus</i>	15	6	4	9	18	2
		<i>L. luctator</i>	1	0	0	0	1	0
		<i>P. cuvieri</i>	1	0	0	0	0	0
TOTAL			66	21	9	36	80	13

MN = Micronúcleo, SEG = Núcleo Segmentado; BR = Célula com broto; RN = Núcleo em forma de Rim; BN = Célula Binucleada.

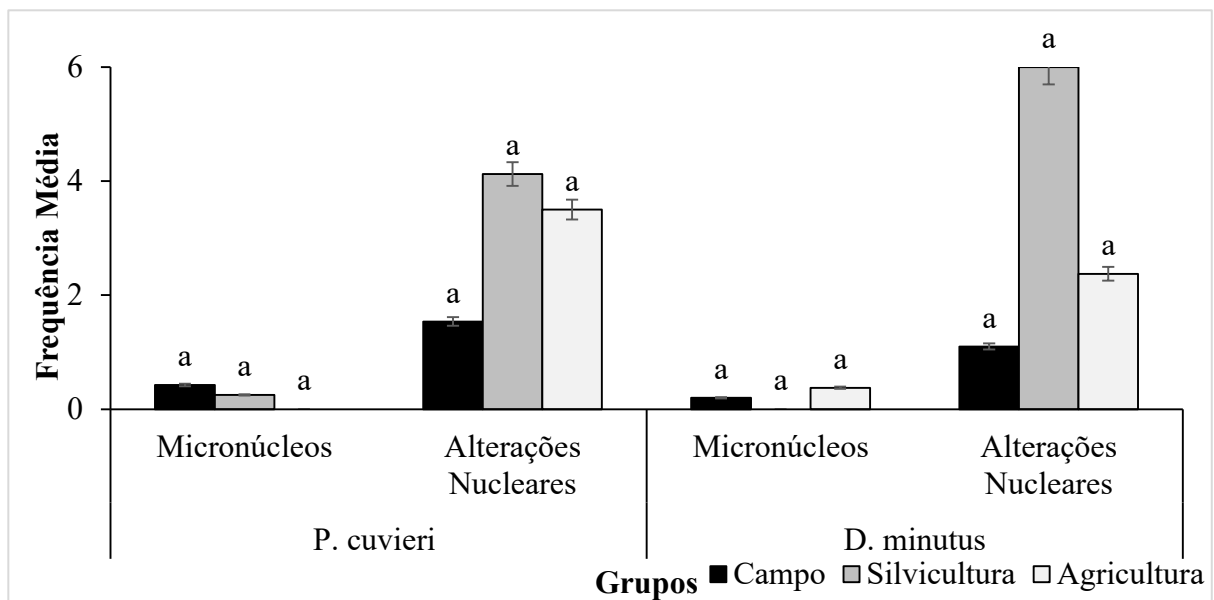
Fonte: Autoria própria (2022)

A espécie *P. cuvieri*, esteve presente em todos os locais amostrados (CN1, CN2, SIL1, SIL2, AGRI1 e AGRI2), sendo capturados 36 exemplares que exibiram um total de 13 MN e 80 alterações eritrocitárias (Tabela 5). Os exemplares de *D.*

minutus apenas não foram amostrados no sítio SIL1, totalizando 28 indivíduos coletados que apresentaram 56 anomalias nucleares e 8 MN. Em contraponto, a coleta de *L. luctator* apenas foi possível em áreas agrícolas (AGRI1 e AGRI2) sendo coletados 2 indivíduos, que manifestaram somente células reniformes (Tabela 5 e 6).

Entretanto, a frequência média de anormalidades eritrocitárias nucleares e de micronúcleos das espécies *D. minutus* e *P. cuvieri*, por área avaliada, mostraram-se semelhantes estatisticamente entre as áreas agrícolas, de silvicultura e de campo nativo (Figura 8). A espécie *L. luctator*, coletada em menor número de indivíduos, não manifestou a presença de MN (Tabela 5 e 6). Desta forma, as espécies responderam de forma semelhante às áreas avaliadas. Este resultado é relevante porque as espécies podem responder de forma diferente aos agentes xenobióticos a que são expostos (MONTEIRO *et al.*, 2018) e, assim, a avaliação ambiental com mais de uma espécie pode fornecer respostas mais abrangentes da genotoxicidade (CAMPANA *et al.*, 2003). Gonçalves *et al.* (2019), por exemplo, identificaram que *D. minutus* foi a espécie mais vulnerável ao ambiente agrossistêmico avaliado em comparação com *P. cuvieri*, pelo ensaio do cometa e teste de micronúcleos.

Figura 8. Média da frequência de MN e alterações nucleares nas espécies *P. cuvieri* e *D. minutus*.

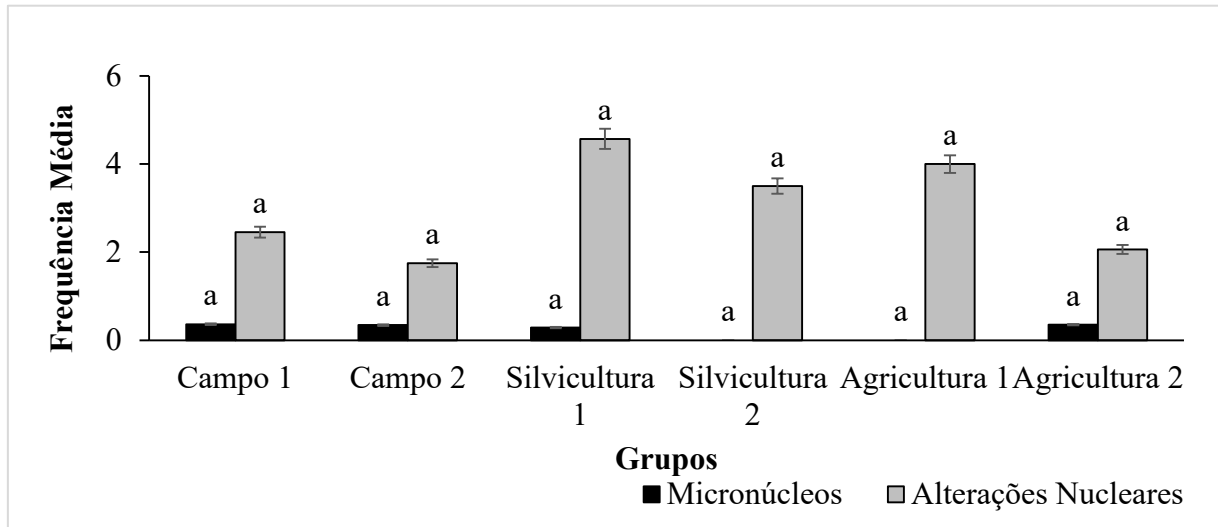


Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

Inclusive, com relação à frequência média de micronúcleos e de alterações nucleares em cada área avaliada (AGRI1, AGRI2, SIL1, SIL2, CN1 e CN2) (Figura 9) pode-se observar que não houve nenhuma variação estatisticamente significativa entre as áreas agrícolas (AGRI1 e AGRI2) e silvicultura (SIL1 e SIL2) em relação às áreas preservadas de campo nativo (CN1 e CN2) (Figura 9).

Figura 9. Média da frequência de MN e alterações nucleares de cada ponto de coleta.



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

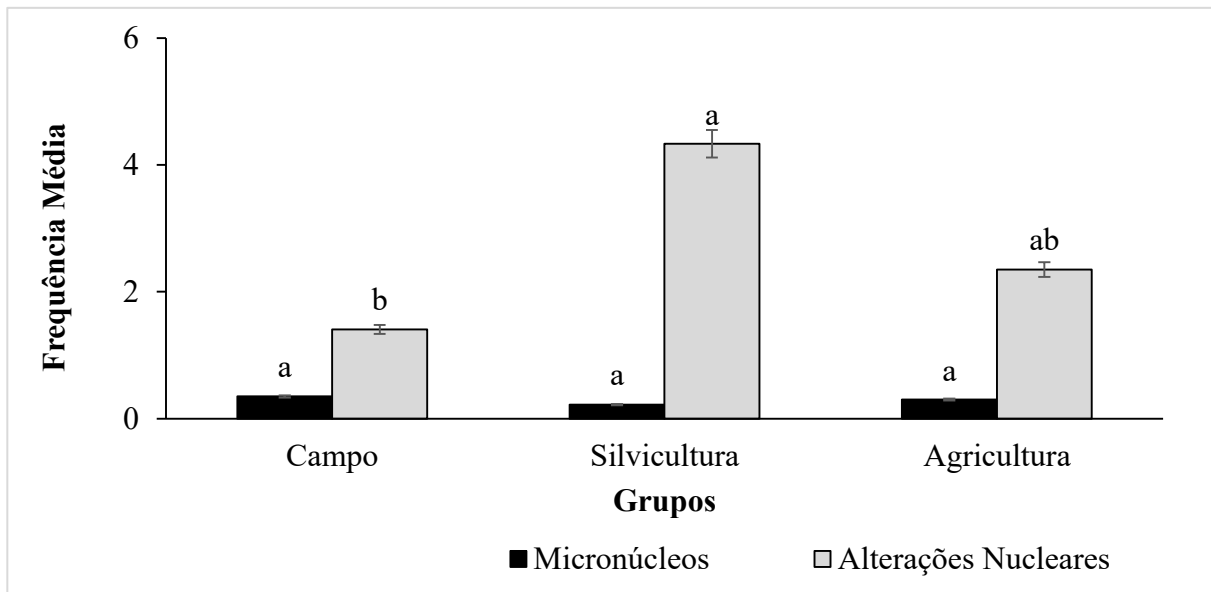
Entretanto, as frequências médias de micronúcleos e alterações nucleares por ambiente avaliado (agricultura, silvicultura e campo nativo) (Figura 10) observou-se que a área de silvicultura apresentou frequência média de alterações nucleares estatisticamente maior que a área preservada de campo nativo. Borges *et al.* (2019) também mostraram maiores frequências de anormalidades de eritrócitos nucleares em áreas de cultivo em comparação com as unidades de conservação para *Scinax fuscovarius*. O presente resultado é um indicativo de resposta celular a uma condição adversa a que o organismo esteja sendo exposto, a fim de eliminar células com danos genéticos (RAY *et al.*, 2005), mostrando o potencial genotóxico desses contaminantes (GREGORIO *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2019; PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2019; ALNOAIMI *et al.*, 2021). Nada obstante, experimentos em plantações de *Pinus* revelaram a liberação de compostos fenólicos com potencial

alelopáticos e mutagênicos para o solo, água e sedimento em áreas de silvicultura (DUTRA; VARGAS, 2017).

A maior frequência de alterações nucleares da área de silvicultura pode ser devido aos seus elevados teores de ORP, aos maiores teores de TNU, DBO e DQO e menor valor de pH dentre todas as lagoas (Tabela 3). Santos *et al.* (2021) também identificaram elevada frequência de alterações nucleares de *Lithobates catesbeianus* expostos a águas de rio com elevada DBO. Já é destacado que a presença de agentes químicos ou físicos, juntamente com outras perturbações do habitat, como o uso do solo por silvicultura do presente estudo, podem ter um impacto significativo sobre as espécies de anfíbios, contribuindo para o declínio das populações de anuros (BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2020). Assim, considerando ser uma área ocupada por silvicultura, o próprio cultivo pode ter influenciado neste efeito citotóxico. Dutra *et al.* (2014), por exemplo, confirmaram o potencial citotóxico do extrato aquoso de *Pinus taeda* pelo teste de Ames com *Salmonella typhimurium*.

A análise dos componentes principais (Figura 11) mostrou que houve acentuada presença de alterações nucleares, DBO, DQO, NTU e ORP nas lagoas de Silvicultura 1 e 2 em relação às demais áreas. A PCA também revelou que há correlação positiva entre as frequências de alterações nucleares com o ORP, NTU e agroquímicos, e correlação fortemente negativa com SI, STD e pH. Peluso *et al.* (2022) similarmente identificaram potencial genotóxico das águas do Rio Arrecifes (Buenos Aires, Argentina) para *Rhinella arenarum*, assim como, elevada turbidez dessas águas. Em outro precedente Peluso *et al.* (2020b) verificaram maior saúde global dos organismos *Rhinella fernandezae* dentro de uma reserva natural que os expostos por atividades industriais ou agrícolas, com correlação com a presença de agroquímicos nas águas do rio avaliado. Por outro lado, Babini *et al.* (2016), observaram a interferência da turbidez em lagoas de agroecossistemas, associando efeitos genotóxicos, com maior mortalidade de girinos, menos metamorfoses e menor quantidade de alimentação de girinos e prevalência de anormalidades nucleares e frequência de MN. Wood e Richardson (2009) igualmente relataram que a adição de sedimentos resultando em menor transparência causam interferência na sobrevivência de girinos.

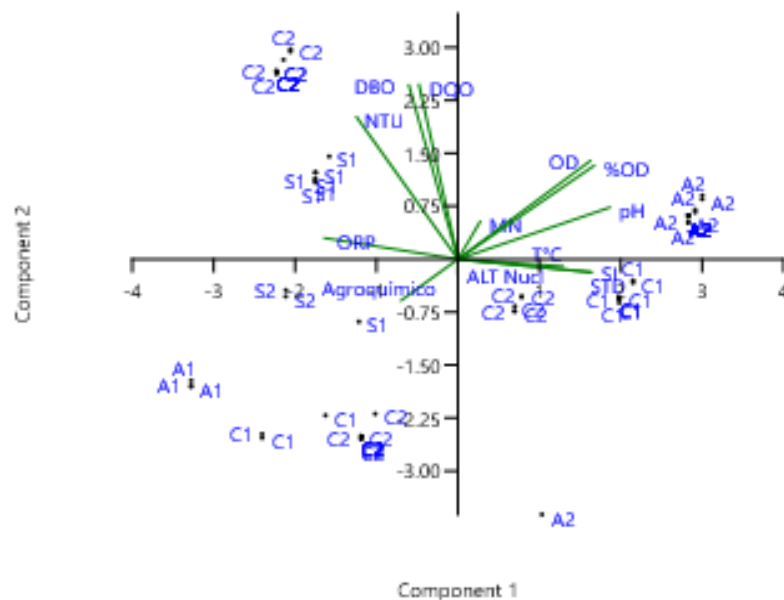
Figura 10. Média da frequência de MN e alterações nucleares nos três ambientes amostrados.



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 11 – Análise dos componentes principais (PCA) das variáveis descritoras.

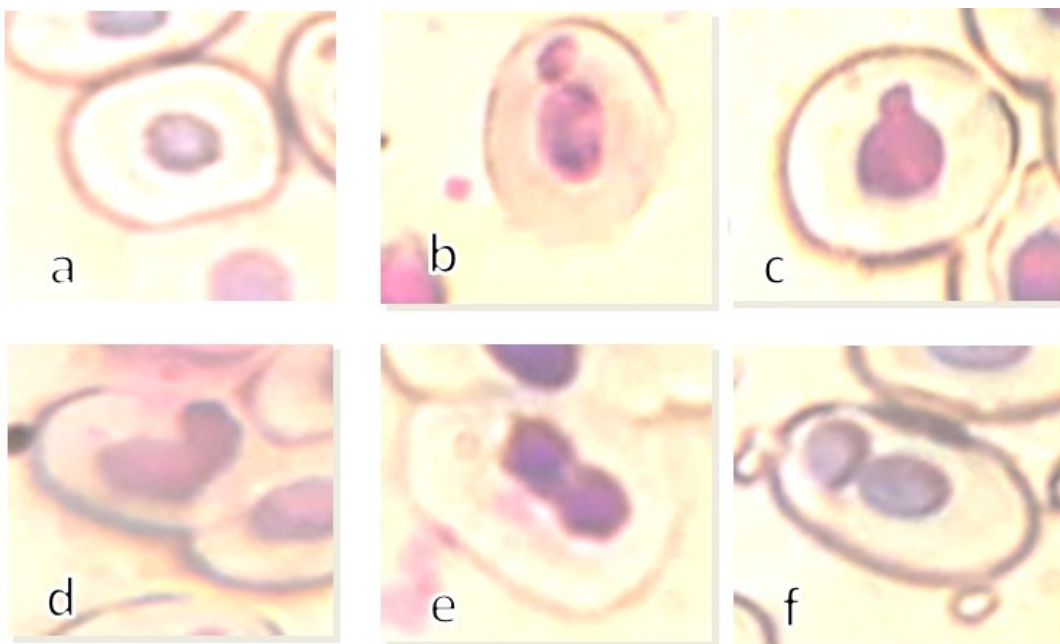


A1: Lagoa de Agricultura 1 (dentro do RVS-CP); A2: Lagoa de Agricultura 2 (fora do RVS-CP);
 C1: Lagoa de Campo 1, C2: Lagoa de Campo 2, S1: Lagoa de Silvicultura 1, S2: Lagoa de Silvicultura 2; SI: condutividade (SI), T° C: temperatura, ORP: potencial de oxidação-redução, NTU: turbidez, OD: oxigênio dissolvido, TDS: sólidos dissolvidos totais, DBO: demanda bioquímica de oxigênio, DQO: demanda química de oxigênio, ALT Nucl: alterações nucleares, MN: micronúcleo.

Fonte: Autoria própria (2022)

De forma geral, fica evidente que houve maior proporção de células com alterações eritrocitárias em todas as áreas avaliadas (Figuras 9 e 10), sendo que a anormalidade nuclear mais frequente das áreas amostradas foram células reniformes, seguido de células com broto, e as demais alterações detectadas com menor expressão (Tabela 6 e Figura 12). Os núcleos reniformes podem representar um precursor para a formação de micronúcleos ou células binucleadas (HARABAWY e MOSLEH, 2014) e o broto nuclear é classificado como uma estrutura semelhante ao micronúcleo ligado ao núcleo da célula por cromatina (PRIETO *et al.*, 2008; DELGUERCIO *et al.* 2017), assim, sua origem provavelmente é a mesma do micronúcleo. Colhe-se, ao ensejo, que as anormalidades nucleares registradas asseveram a presença de compostos genotóxicos no ambiente, mesmo que os micronúcleos apresentem proporções menores (POLLO *et al.*, 2019).

Figura 12. Variação morfológica nos eritrócitos avaliados nas espécies *P. cuvieri*, *D. minutus* e *L. luctator*. a) eritrócito normal. b) eritrócito micronucleado. c) célula com broto. d) célula reniforme. e) célula binucleada. f) célula segmentada.



Fonte: Autoria própria (2022)

O ponto de coleta da AGRI1 (Figura 9) também apresentou elevada frequência de alterações nucleares e, assim como nas lagoas de silvicultura, foi a

que apresentou alto valor de DQO, o maior teor de ORP e o menor valor de pH, além de baixos teores de OD, % OD e a presença de agroquímicos (Tabela 3). De acordo com a PCA (Figura 11), há visível incidência de agroquímicos na lagoa de agricultura 1 e baixa presença de OD, %OD, e baixo teor de pH. Arcaute *et al.* (2014) comprovaram que o inseticida Imidacloprido, presente no sedimento da lagoa de AGRI1, resultou em aumento na frequência de anormalidades nucleares de girinos de *Boana pulchella*. Peltzer *et al.* (2008) observaram que as variáveis químicas como pH, temperatura, turbidez, concentrações de oxigênio dissolvido, nitrato e o agroquímico endosulfan, contribuíram negativamente para a sobrevivência, crescimento e taxa de desenvolvimento dos anuros em áreas agrícolas. Consoante, Ascoli-Morrete *et al.* (2022) demonstram uma correlação positiva entre danos genotóxicos e degradação da qualidade ambiental em áreas agrícolas.

Com relação as frequências de micronúcleos, as lagoas que apresentaram as maiores frequências foram as lagoas de campo e de agricultura 2. De acordo com a análise do biplot (Figura 11), há incidência de elevado teor de OD, %OD, pH, SI, STD na lagoa de agricultura 2 (fora do RVS-CP) e, correlação positiva entre as frequências de micronúcleos e os teores de OD, %OD, pH, DQO e DBO. Santos *et al.* (2021) também identificaram elevada frequência de micronúcleos de *Lithobates catesbeianus* expostos a águas de rio com elevada DQO e DBO. De forma análoga, Assis *et al.* (2021) em avaliação *in situ* de uma área agrícola e outra preservada, registraram uma incidência de micronúcleos 3,6 vezes mais frequentes na plantação de soja. Igualmente Ascoli-Morrete *et al.* (2022) observaram incidência de micronúcleos nos eritrócitos de *L. luctator* apenas na matriz agrícola, enquanto na área de mata não houve registros. Já no âmbito dos ensaios crônicos, Samojeden *et al.* (2022) relataram a formação de micronúcleos e outras alterações celulares com níveis significativos em *L. luctator* e *P. cuvieri*, expostos a concentrações do agroquímico imidacloprido. Herek *et al.* (2021) determinaram maior formação de micronúcleos em eritrócitos de *P. cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, ambas espécies expostas a um herbicida à base de glifosato. Em corroboração, Pavan *et al.* (2021) avaliaram a exposição de girinos de *Boana faber* e *L. latrans* a partir da mistura de dois herbicidas, registrando maior indução de micronúcleos em *B. faber*.

Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas entre as áreas de campo natural, agricultura e silvicultura, afigura-se ponderar que as pesquisas *in situ* sofrem interações de outras variáveis além das abordadas nesse estudo. Pois os anfíbios são normalmente expostos a mais de um contaminante que é influenciado pela dinâmica do ambiente (AZIZISHIRAZI *et al.*, 2021).

Nesse precedente, compostos presentes na água têm interações sinérgicas ou antagônicas (PELUSO *et al.*, 2021; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014). Dyck *et al.* (2021) realizaram estudo de campo em valas de drenagem com vegetação e recém-desmatadas/dragadas em um agroecossistema utilizando o anuro *Lithobates pipiens* para avaliação da sobrevivência, crescimento e desenvolvimento embrionário. Os resultados demonstraram que os sistemas de valas recém-limpos e dragados não tiveram efeitos prejudiciais óbvios nos girinos mesmo na presença de agroquímicos, sendo o parâmetro temperatura o determinante principal para retração ao crescimento e desenvolvimento. Peluso *et al.* (2021) em avaliação da toxicidade de dois herbicidas em girinos de *Rhinella arenarum*, revelaram que a mistura equitóxica sugeriu uma interação antagônica dos compostos. No entanto, as misturas não equitóxica do glifosato e 2,4 -DBH indicou a presença de sinergismo. Freitas *et al.* (2022) alertaram sobre os efeitos interativos das substâncias no meio ambiente em ensaio *in situ* com os agroquímicos fipronil e 2,4-D que induziram números expressivos de implicações subletais em girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Lithobates catesbeianus*. Lajmanovich *et al.* (2019) avaliaram a toxicidade do herbicida à base de glifosato (GBH) e arsenito (AsIII) e concluíram que houve uma porcentagem significativa maior de danos ao DNA nos girinos expostos à mistura GBH-As, devido ao efeito sinérgico. Pinto-Vida *et al.* (2022), em estudo da nocividade do lítio e selênio no músculo da cauda de girinos de rã-touro durante a metamorfose destacaram a importância da avaliação das misturas que podem ocorrer no meio ambiente, uma vez que a combinação de contaminantes pode provocar toxicidade distinta em comparação com os efeitos desencadeados pelos produtos químicos isolados. Boccioni *et al.* (2021) relataram que as combinações de herbicida, inseticida e antibióticos mostraram vários efeitos subletais no desenvolvimento de anfíbios, evidenciando o alto risco ecotoxicológico dos estágios iniciais do desenvolvimento de anfíbios anuros expostos. Com efeito, alertaram

sobre a crescente demanda de estudos relacionados aos danos toxicológicos dessas misturas e como esses diferentes produtos químicos podem interagir e alterar a disponibilidade uns dos outros na água. Os agroquímicos também podem interagir com outros fatores abióticos com a radiação ultravioleta, aumentando a suscetibilidade do organismo a danos genéticos (Yu *et al.* 2015).

Assim, claramente, os estressores antropogênicos e naturais reiteradamente interatuam. A presença de diferentes compostos com mecanismo de ação diversos, influencia diretamente na ação biológica dos organismos, com resultados subjetivos e imprevisíveis (BUCK *et al.* 2015; CARRASCO *et al.*, 2021; DENEER 2000).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela relevância e complexibilidade da relação entre os anfíbios e os ecossistemas, o teste do micronúcleo, em uma estratégia *in situ*, é um método eficaz para a detecção de mutagênese cromossômica induzida por xenobióticos. As espécies empregadas são bioindicadores em potencial, uma vez que se mostraram sensível a alterações ambientais, e foram igualmente reconhecidos em outras pesquisas (ASCOLI-MORRETE *et al.*, 2022; BORGES *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2019).

De modo distinto, os resultados ambíguos, com ausência ou baixa frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares não significa a privação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos no ambiente, mas sim, que os processos nos ecossistemas apresentam interações sutis com outros componentes e estão relacionados as substancias presentes, dose, parâmetros físico-químicos, características e estágio de desenvolvimento das espécies conexas.

A Unidade de Conservação RVS-CP tolera a utilização sustentável dos recursos existentes com o manejo do uso humano na natureza. Nesse cenário, para contribuir e fortalecer o sistema de áreas de preservação ambiental e a sua biodiversidade é fundamental o monitoramento das ações antrópicas que estão correndo dentro da unidade, principalmente ao que se refere ao uso dos agroquímicos e sua dispersão em áreas não cultivadas e os domínios de silvicultura,

que se encontram nebulosos, pela falta de estudos associados a liberação de compostos fenólicos com potencial mutagênico para anfíbios.

Dessa feita, o presente trabalho espera ter contribuído com os estudos genotóxicos e fornecido subsídios para pesquisas futuras visando medidas de gestão ambiental aprimoradas e estratégias de conservação para populações de anuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. NBR 9897. Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores – Procedimento. 1987.

_____. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. NBR 9.898. Preservação e técnicas de amostragem de afluentes líquidos e corpos receptores – Procedimento. 1987.

ADAMS, E.; BRÜHL, C.A. Fungicide Exposure Induces Sensitivity Differences in Aquatic Life Stages of European Common Frogs (*Rana temporaria*). *Journal of Herpetology*, Vol. 54, n. 3, p. 331–336, 2020.

AGUASPARANÁ. Sistema de Informações Hidrológicas – SIH. **Instituto das Águas do Paraná/ Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos**. 2020. Disponível em: <<http://www.aguasparana.pr.gov.br/pagina-264.html#>>. Acesso em: 11.mai. 2020.

ALBERTINI, R. J. ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; DAVID E.G. SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALLRAN, J.W.; KARASOV, W.H. Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 769–775, 2001.

ALNOAIMI, F.; DANE, H.; SISMAN, T. Histopathologic and genotoxic effects of deltamethrin on marsh frog, *Pelophylax ridibundus* (Anura: ranidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p. 3331–3343, 2021.

APHA/AWWA/WEF. (2018).; et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington: American Public Health Association. 1082 p
SITE
<https://www.standardmethods.org/action/showTopic?taxonomyUri=part&topicCode=part2000>.

ARAÚJO, A.P.C.; DE MELO, N.F.S.; DE OLIVEIRA JUNIOR, A.G.; RODRIGUES, F.P.; FERNANDES, T.; VIEIRA J.E.A.; ROCHA, T.L.; ALAFAIA, G. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 1-20, 2020.

ARCAUTE, C.R.; PÉREZ-INGLESIS, J.M.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G.S.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L., Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v.45, p. 632-639, 2014.

ASCOLI-MORRETE, T.; BANDEIRA, N.M.G.; SIGNOR, E.; GAZOLA, H.A.; HOMRICH, I.S.; BIONDO, R.; ROSSATO-GRANDO, L.G.; ZANELLA, N. Bioaccumulation of pesticides and genotoxicity in anurans from southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 45549–45559, 2022.

ASSIS, R.A.; REZENDE, W.R.; SANTOS, C.G.A.; BENVINDO-SOUZA, M.; AMORIM, N.P.L.; BORGES, R.L.; FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C.; SANTOS, L.R.S. Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savana. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2021.

ATTADEMO, A.M.; BOCCIONI, A.P.C.; PELTZER, P.M.; FRANCO, V.G.; SIMONIELLO, M.F.; PASSEGGI, M.C.G.; LAJMANOVICH, R.C. Effect of microplastics on the activity of carboxylesterase and phosphatase enzymes in *Scinax squaleirostris* tadpoles. **Environ Monit Assess**, v.194, n° 718, p.1-10, 2022.

AVILA, C.; REYES, C.; BAYONA, J.M.; GARCIA, J. Emerging organic contaminant removal depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Influence of redox. **Water Research**, v. 47, p. 315-325, 2013.

AZIZISHIRAZI, A.; KLEMISH, J.L.; PYLEB, G.G. Sensitivity of Amphibians to Copper. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1808–1819, 2021.

BABINI, M.S.; BIONDA, C.L.; SALAS, N.E.; MARTINO, A.L. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. **Environ Monit Assess**, v. 188, n.459, p.1-14, 2016.

BABINI, M.S., BIONDA, C., SALINAS, Z.A., SALAS, N.E., MARTINO, A.L. Reproductive endpoints of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae): populations that persist in agroecosystems and their use for the environmental health assessment. **Ecotoxicol Environ Safe**, v. 154, p. 294-301, 2018.

BARRETO, C.G.; BRAZ, V.S.; FRANÇA, F.G.R. Lições para a Biologia da Conservação no Cerrado a partir dos Padrões de Diversidade Genética Populacional do Anfíbio *Physalaemus cuvieri*. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v.5, n. 3, p. 101-119, 2016.

BASTOS, R.P.; LIMA, L.P.; PASQUALI, M.S. **Sapos, rãs e pererecas: desvendando o segredo dos anfíbios**, 1ª ed. R.P. Bastos, Goiânia: 2003.

BEATTIE, R.C.; TYLER-JONES, R. The effects of low pH and aluminum on breeding success in the frog *Rana temporaria*. **Journal of Herpetology**, v.26, p. 353-360, 1992.

BENVINDO-SOUZA, M.; OLIVEIRA E.A.S.; ASSIS, R.A.; SANTOS; C.G.A.; BORGES, R.E.; DE MELO E SILVA D.; SANTOS, R.S. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, p.1-7, 2020.

BERNAL, M.H.; ALTON, L.A.; CRAMP, R.L.; FRANKLIN, C.E. Does simultaneous UV-B exposure enhance the lethal and sub-lethal effects of aquatic hypoxia on

developing anuran embryos and larvae? **J Comp Physiol B**, v.181, p. 973–980, 2011.

BERNARDON, A.; SOARES, A.B. Campos de Palmas: um ecossistema ameaçado. **Agropecuária Catarinense**, v.29, n.3, p.15-17, 2016.

BISH, M.; OSELAND, E.; BRADLEY, K. Off-target pesticide movement: a review of our current understanding of drift due to inversions and secondary movement. **Weed Technol**, v.35, p. 345–356, 2021.

BLAUSTEIN, A.R.; HAN, B.A.; RELYEA, R.A.; JOHNSON, P.J.T.; BUCK, J.C.; GERVASI, S.S.; KATS, L.B. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223 p. 108–119, 2011.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M.; HATCH, A.C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 123-140, 2003.

BOCCIONI, A.P.C.; LAJMANOVICH, R.C.; PELTZER, P.M.; ATTADEMO, A.M.; MARTINUZZI, C.S. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Chemosphere**, v. 273, 128475, 2021

BOKONY, V.; VEREBÉLYI, V.; UJHEGYI, N.; MIKO, Z.; NEMESHAZI, E.; SZEDERKENYI, ORF, S.; VITANYI, E.; MORICZ, A.M. Effects of two little-studied environmental pollutants on early development in anurans. **Environmental Pollution**, v.260, p. 1-10, 2020.

BOLOGNESI, C. Review Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251–272, 2003.

BONEBRAKE, T.C.; FENGYI G.; DINGLE, C.; BAKER, D.M.; KITCHING, R.L.; ASHTON, L.A.; Integrating proximal and horizon threats to biodiversity for conservation. **Trends in Ecology & Evolution, September**, v.34, n.9, p. 781- 788, 2019.

BONFANTI, P., SAIBENE, M., BACCHETTA, R., MANTECCA, P., COLOMBO, A. A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v.195, p. 103-113, 2018.

BORGES, R.E; SANTOS, L.R.S; BENVINDO-SOUZA, M. MODESTO R.S.; ASSIS R.A.; OLIVEIRA, C. Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, p. 22–28, 2019.

BOUALIT, L.; CAYUELA, H.; CATTIN, L.; CHÈVRE, N. The Amphibian Short-Term Assay: Evaluation of a New Ecotoxicological Method for Amphibians Using Two Organophosphate Pesticides Commonly Found in Nature—Assessment of Biochemical, Morphological, and Life-History Traits. **Environmental Toxicology and Chemistry**, p. 1–12, 2022.

BRADFORD, B.Z.; HUSETH, A.S.; GROVES, R.L. Widespread detections of neonicotinoid contaminants in central Wisconsin groundwater. **Plos One**, p. 1-17, 2018.

BRASIL. Decreto de 3 de abril de 2006. Cria o Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas, no Estado do Paraná, e dá outras providências. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 abr. 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Dnn/Dnn10807.htm>. Acesso em: 10 jun. 2020.

_____. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA** nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BRIZZI, R.; DELFINO, G.; PELLEGRINI, R. Specialized mucous gland and their possible adaptive role in the males of some species of *Rana* (Amphibia, Anura). **Journal of Morphology**, v. 244, p. 328-341, 2002.

BRODMAN, R.; OGGER, J.; BOGARD, T.; LONG, A.J.; PULVER, R.A.; MANCUSO, K.; FALK, D. Multivariate analyses of the influences of water chemistry and habitat parameters on the abundances of pond-breeding amphibians. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 18, n. 3, p. 425-436, 2003.

BROOMHALL, S. The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 61, p. 243-250, 2002.

BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BERSTEN, B.E. Química, a ciência central. 9ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 992 p. 2005.

BRÜHL, C.A.; PIEPER, S.; WEBER, B. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 2465–2472, 2011.

BUCK, J.C.; HUA, J.; BROGAN, W.R.; DANG, T.D.; URBINA, J.U.; BENDIS, R.J.; STOLER, A.B.; BLAUSTEIN, A.R.; RELYEA, R.A. Effects of pesticide mixtures on host-pathogen dynamics of the amphibian chytrid fungus. **PLos One**, v. 10, n. 7, 2015.

BUENO, M.R.; CUNHA, J.P.A.R. Environmental risk for aquatic and terrestrial organisms associated with drift from pesticides used in soybean crops. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, p.1-16, 2020.

CALDERON, M.R.; ALMEIDA, C.A.; GONZÁLEZ, P.; JOFRÉ, M.B. Influence of water quality and habitat conditions on amphibian community metrics in rivers affected by urban activity. **Urban Ecosystems**, v. 22, p.743–755, 2019.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genet. Mol. Biol.** v. 26, p. 99-103, 2003.

CAMPBELL, K.S.; KELLER, P.G.; HEINZEL, L.M.; GOLOVKO, S.A.; SEEGER, D.R.; GOLOVKO, M.Y.; KERBY, J.L. Detection of imidacloprid and metabolites in Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) brains. **Science of the Total Environment**, v. 813, p. 1-7, 2022.

CARDOSO, R.L.; CARVALHO-NETA, R.N.F.; CASTRO, A.C.L.; FERREIRA, C.F.C.; SILVA, M.H.L.; AZEVEDO, J.W.J.; SOBRINHO, J.R.S.C.; SANTOS, D.M.S. Histological and Genotoxic Biomarkers in *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) for Environmental Assessment in a Protected Area in the Northeast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.101, p. 570-579, 2018.

CARPENTER, S.R.; CARACO, N.E.; CORRELL, D.L.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological Applicationis**, v.8, n. 3, p. 559-568, 1998.

CARPENTER, S.R.; EMILY H. STANLEY, E.H.; VANDER ZANDEN, M.J. State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 36, p. 75-99, 2011.

CARRASCO, G.H.; BENVINDO-SOUZA, M.; SANTOS, L.R.S. Effect of multiple stressors and population decline of frogs. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 59519–59527, 2021.

CECH, R.; ZALLER, J.G.; LYSSIMACHOU, A.; CLAUSING, P.; HERTOGE, K.; LINHART, C.; Pesticide drift mitigation measures appear to reduce contamination of non-agricultural areas, but hazards to humans and the environment remain. **Science of the Total Environment**, v.854, 2023.

CFMV. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/porta/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2020.

CHAMBERS. D.L. Increased Conductivity Affects Corticosterone Levels and Prey Consumption in Larval Amphibians. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 2, p. 219-223, 2011.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249–261, 2004.

COLLINS, J.P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 89–98, 2003.

CRANE, M.; BURTON, G.A.; CULP, J.M.; GREENBERG, M.S.; MUNKITTRICK, K.R.; RIBEIRO, R.; SALAZAR, M.; ST-JEAN, S.D. 2007. Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis. *Integrated Environ. Integrated Environmental Assessment and Management*, v.3, n. 2, p. 234-245, 2007.

CRUZ-ESQUIVEL, A.; VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRETE, J. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the SinA River, Colombia. **Environ Sci Pollut**, v. 2, p. 427392–27401, 2017.

CUMMINS, C.P. Interaction Between the Effects of pH and Density on Growth and Development in *Rana Temporaria* L. Tadpoles. **Functional Ecology**, v. 3, n. 1, p. 45-52, 1989.

DAVIDSON, C.; KNAPP, R.A. Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. **Ecological Applications**, v.17, n.2, p. 587–597, 2007.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p.121–135, 2002.

DEL-GUERCIO, A.M.F.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; FONTANETTI, C.S. Avaliação da eficiência do tratamento de esgoto doméstico pelo teste do micronúcleo em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Eng Sanit Ambient**, v. 22, n.6, p. 1122–1128, 2017.

DONALD, D.B. Water quality limitations for tadpoles of the Wood Frog in the northern Great Plains, Canada. **Environ Monit Assess**, v. 193, n. 636, 2021.

DENEER, J.W. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. **Pest Management Science**, v. 56, p. 516-520, 2000.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. Baltimore, London, McGrawHill Publications Corporation, 670p. 1986.

DUELLMAN, W.E; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York, McGraw-Hill, 670p. 1994.

DUTRA, B. K.; LEMOS, A.T.; NIEC, J.; **Avaliação sazonal do potencial mutagênico de extratos aquosos de *Pinus taeda* e *Araucaria angustifolia***. In: XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2014, Guarapari. XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2014.

DUTRA, B.K.; VARGAS, V.M.F. *Pinus taeda* na região dos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul: uma revisão sobre alterações biológicas. **FEPAM em Revista**, v. 11, p. 26-32, 2017.

DYCK, A.; ROBINSON, S.A.; YOUNG, S.D.; RENAUD, J.B.; SABOURIN, L.; LAPEN, D.R.; PICK, F.R. The Effects of Ditch Management in Agroecosystems on Embryonic and Tadpole Survival, Growth, and Development of Northern Leopard Frogs (*Lithobates pipiens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 107–122, 2021.

EPPEL, J.; MAGUHN, J.; SPITZAUER, P.; KETTRUP, A. Input of pesticides by atmospheric deposition. **Geoderma**, v. 105, p. 327–349, 2002.

- ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p. 1998.
- FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; OLIVEIRA, C. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution**, v. 237, p. 93-102, 2018.
- FARAG, M.R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018.
- FAULWETTER, J.L.; GAGNONB, V.; SUNDBERGC, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M.D.; BRISSONB, J.; CAMPER, A.K.; STEINA, O.R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. **Ecological Engineering**, v. 35, p. 987–1004, 2009.
- FELLERS, G.M.; MCCONNELL, L.L.; PRATT, D.; DATTA, S. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada mountains of California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 2170–2177, 2004.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere**, v. 56, p. 457–463, 2004.
- FERNANDEZ-ALBA, A.R.; VALVERDE, A.; AGÜERA, A.; CONTRERAS, M.; CHIRON, S.; Determination of imidacloprid in vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p. 97-105, 1996.
- FICKEN, K. G.; BYRNE, P. G. Heavy metal pollution negatively correlates with anuran species richness and distribution in South-Eastern Australia. **Austral Ecology**, v. 38, p. 523–533, 2013.
- FOCUS. **Pesticides in air: considerations for exposure assessment**. Report of the FOCUS Working Group on Pesticides in Air. 327p. 2008.
- FOKOUA, A.M.T.; LEGRAND NONO GONWOUO, L.N.; TAMESSE, T.L.; DOHERTY-BONE, T.M. Value of forest remnants for montane amphibians on the livestock grazed Mount Mbam, Cameroon. **Amphibian & Reptile Conservation**, v.13, n.2, p. 68–81, 2019.
- FREITAS, J.S.; PINTO, T.J.S.; YOSHII, M.P.C.; CONCEIÇÃO, L.; SILVA, M.; LOPES, L.F.P.; OGURA, A.P.; GIROTTO, L.; MONTAGNER, C.C.; ALHO, L.O.G.; GEBARA, R.C.; SCHIESARI, L.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, 2022.

FRENICH, A.G.; GONZALEZ, F.J.E; VIDAL, J.L.M.; VAZQUEZ, P.P.; SANCHEZ, M.M. Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v.869, p. 497–504, 2000.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. **American Museum of Natural History**, Version 6.0. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/htm>>. Acesso em: 01.nov. 2022.

GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; BERECKA, B.; BARTOSZEWICZ, J.; BUSZEWSKI, B. Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 13, n. 5, p. 453-462, 2004.

GARCÍA-MUÑOZ, E.; F. GUERRERO, F.; PARRA, G. Effects of Copper Sulfate on Growth, Development, and Escape Behavior in *Epidalea calamita* Embryos and Larvae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 557–565, 2009.

GAUTHIER, L.; TARDY, E.; MOUCHET, F.; MARTY, J. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. **Science of the Total Environment**, v. 323, p. 47- 61, 2004.

GAVEL, M.J.; YOUNG, S.D.; DALTON, R.L.; SOOS, C. MCPHEE, L.; FORBES, M.R.; ROBINSON, S.A. Effects of two pesticides on northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) stress metrics: Blood cell profiles and corticosterone concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 235, p. 1-9, 2021.

GLOS, J.; GRAFE, T.U.; RODEL, M.O.; LINSENMAIR, K.E. Geographic variation in pH tolerance of two populations of the European common frog, *Rana temporaria*. **COPEIA**, Ed. 3. p. 650-656, 2003.

GOESSENS, T.; DE BAERE, S.; DEKNOCK, A.; DE TROYER, N.; VAN LEEUWENBERG, R.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; GOETHALS, P.; LENS, L.; SPANOGHE, P.; VANHAECKE, L.; CROUBELS, S. Agricultural contaminants in amphibian breeding ponds: Occurrence, risk and correlation with agricultural land use. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 1-13, 2022.

GONÇALVES, M.W.; CAMPOS, C.B.M.; GODOY, F.R.; GAMBALE, P.G.; NUNES, H.F.; NOMURA, F. BASTOS, R.P. CRUZ, A.D.; SILVA, D.M. Assessing Genotoxicity and Mutagenicity of Three Common Amphibian Species Inhabiting Agroecosystem Environment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, p.1-12, 2019.

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

- GONÇALVES, M.W.; OLIVEIRA, H.H.P.; CARVALHO, W.F.; SILVA, D.M.; NOMURA, F.; BASTOS, R.P.; DA CRUZ, A. D. Análises mutagênicas de anuros em áreas de mineração de níquel. **Estudos**, v. 339, n. 2, p. 115-121, 2012.
- GREGORIO, L.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Genotoxic effects of 4-nonylphenol and Cyproterone Acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 879–884, 2019.
- HADDAD, C.F.B. Anfíbios. In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M.; Paglia, A.P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção - Volume 2**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente. p. 327–373, 2008.
- HARABAWY, A.A.; MOSLEH, Y. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia. *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicol Environ Safe**, v.104, p.28-35, 2014.
- HAYES, T.B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V.P.; MARJUOA, Y.; PARKER, J. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and Amphibian declines: are we underestimating the impact? **Environ Health Perspect**, v.114, p.40–50, 2006.
- HAYES, T.B.; FALSO P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921–933, 2010.
- HECNAR S.J.; M'CLOSKEY R.T. (1996) Amphibian species richness and distribution in relation to pond water chemistry in south-western Ontario, Canada. **Freshwater Biology**, v. 36, p. 7–15, 1996.
- HEINEN, J.T. Comparisons of the leaf-litter herpetofauna in abandoned cacao plantations and primary rainforest in Costa-Rica - some implications for faunal restoration. **Biotropica**, v.24, n. 3, p. 431–439, 1992.
- HEREK, J.S.; VARGAS, L.; TRINDADE, S.A.R.; RUTKOSKI, C.F.; MACAGNAN, N.; HARTMANN, P.A.; HARTMANN, M.T. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.81, 2021.
- HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 872p. 2004.
- HOLT, E.A.; MILLER, S.W. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. **Nat Educ Knowl**, v.3, p.1-10, 2011.
- HOME, M.T.; DUNSON, W.A. Effects of Low pH, Metals, and Water Hardness on Larval Amphibians. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 29, p. 500-505, 1995.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Plano de manejo Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas**, 2016. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomasbrasileiros/mata-atlantica/unidades-de-conservacao-mata-atlantica/2159-revis-dos-ampos-de-palmas?highlight=WyJwYWxtYXMiXQ==>>. Acesso em: 30 jan. 2020.

IUCN. *A Lista Vermelha da IUCN de Espécies Ameaçadas*. **International Union for Conservation of Nature**. Versão 2020-1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 05 mar. 2020.

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

JOFRE, M.B.; KARA, W.H. Direct effect of ammonia on three species of north american anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, n. 8, p. 1806–1812, 1999.

JONES, B.; SNODGRASS, J.W.; OWNBY, D.R. Relative Toxicity of NaCl and Road Deicing Salt to Developing Amphibians, **Copeia**, p. 72-77, 2015.

KARRAKER, N.E.; GIBBS, J.P.; VONESH, J.R. Impacts of road deicing salt on the demography of vernal pool-breeding amphibians. **Ecological Applications**, v.18, 2008.

KLEIN, R. M. 1978. Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí. 24p. 1978. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22KLEIN,%20R.M.%22>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

KO, A.; RAHMAN, M.D.M.; EL-ATY, A.M.A.; JANG, J.; PARK, J.; CHO, S.; SHIM, J. Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 148, p. 402 – 409, 2014.

KRISHNA, S.N, KRISHNA, S.B, VIJAYALAXMI, K.K. Variation in anuran abundance along the streams of the Western Ghats, India. **Herpetological Journal**, v15, n. 3, p. 167-172, 2005.

KWET, A.; LINGNAU, R.; DI-BERNARDO, M. 2010. **Pró-Mata: Anfíbios da Serra Gaúcha, sul do Brasil - Amphibien der Serra Gaúcha, Südbrasilien - Amphibians of the Serra Gaúcha, South of Brazil**. 2. ed. Germany: Brasilien Zentrum, University of Tübingen, 147p. 2010.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182–186, 2003.

LAJMANOVICH, R.C.; PELTZER, P.M.; ATTADEMO, A.M.; MARTINUZZI, C.S.; SIMONIELLO, M.F.; COLUSSI, C.L.; BOCCIONI, A.P.C.; SIGRIST, M. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Heliyon**, v. 5, 2019.

- LANDI, M.; PIAZZINI, S.; NUCCI, A.; SAVERI, C.; ANGIOLINI, C. Can macrophytes be a surrogate for amphibians and physico-chemical features in pond classifications?. *Aquatic Botany*, v. 101, p. 1–7, 2012.
- LEE-JENKINS, S.S.Y.; ROBINSON, S.A. Effects of neonicotinoids on putative escape behavior of juvenile wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) chronically exposed as tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 12, p. 3115–3123, 2018.
- LENKOWSKI, J.R., SANCHEZ-BRAVO, G., MCLAUGHLIN, K.A., 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences*, v.22, p. 1305-1308, 2010.
- LIMA, J.G.G. Influência morfoestrutural na elaboração do relevo na serra da fartura (planalto de Palmas-Pr/Água Doce-Sc) – Sul do Brasil. *Revista de Geografia (UFPE)*, v. 31, n. 3, 2014.
- LOMAN, J.; LARDNER, B. Does pond quality limit frogs *Rana arvalis* and *Rana temporaria* in agricultural landscapes? A field experiment. *Journal of Applied Ecology*, v. 43, p. 690–700, 2006.
- MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Imprensa oficial, Curitiba. 440p. 2002.
- MANN, R.M.; BIDWELL, J.R. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frog. *Environmental Pollution*, v. 114, p. 195-205, 2001.
- MATSON, C.W.; PALATNIKOV, G.M.; MCDONALD, T.J.; AUTENRIETH, R.L.; DONNELLY, K.C.; ANDERSON, T.A.; CANAS, J.E.; ISLAMZADEH, A.; BICKHAM, J.W. Patterns of genotoxicity and contaminant exposure: evidence of genomic instability in the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of sumgayit, Azerbaijan. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n. 8, p. 2055–2064, 2005.
- MCDANIEL, T. V.; HARRIS, M. L.; BISHOP, C. A.; STRUGER, J. Development and survivorship of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) exposed to contaminants in the water and sediments of the St. Lawrence River near Cornwall. *Water Quality Research Journal of Canada*, v.39, n.3, p. 160–174, 2004.
- MCKIBBIN, R.; DUSHENKO, W.T.; VANAGGELEN, G.; BISHOP, C.A. The influence of water quality on the embryonic survivorship of the Oregon spotted frog (*Rana pretiosa*) in British Columbia, Canada. *Science of the Total Environment*, v. 395, p. 28-40, 2008.
- METTS, B. S.; KURT, A.; SCOTT, D. E.; TUBERVILLE, T. D.; HOPKINS, W. A. Interactive effects of maternal and environmental exposure to coal combustion

wastes decrease survival of larval southern toads (*Bufo terrestris*). **Environmental Pollution**, v.164, p. 211-218, 2012.

MIJARES, A.; RODRIGUES, M.T.; BALDO, D. *Physalaemus cuvieri*. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57250A11609155.en>>. Acesso em: 05 mar. 2020.

MILES, J.C.; HUA, J.; SEPULVEDA, M.S.; KRUPKE, C.H.; HOVERMAN, J.T. Effects of clothianidin on aquatic communities: evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids. **Plos One**, v. 23. 2017.

MINA, O.; GALLA, H.E.; ELLIOTTA, H.A.; WATSONC, J.E.; MASHTARED, M.L.; LANGKILDEE, T.; HARPERC, J.P.; BOYERB, E.W. Estrogen occurrence and persistence in vernal pools impacted by wastewater irrigation practices. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 257, p. 103–112, 2018.

MINERIOPAR. Minerais do Paraná S. A. **Geoquímica de solo – horizonte B: Relatório Final de Projeto**. Curitiba, 2005.

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

MOUCHET, F.; BAUDRIMONT, M.; GONZALEZ, P.; CUENOT, Y.; BOURDINEAUD, J.P.; BOUDOU, A.; GAUTHIER, L. Genotoxic and stress inductive potential of cádmium in *Xenopus laevis* larvae. **Aquatic Toxicology**, v.78, p. 157-166, 2006.

MULHOLLAND, P.J.; HELTON, A.M.; POOLE, G.C.; HALL JR, R.O. HAMILTON, S.K.; PETERSON, B.J.; TANK, J.L.; ASHKENAS, L.R.; COOPER, L.W.; DAHM, C.N.; DODDS, W.K.; FINDLAY, S.E.G.; GREGORY, S.V.; GRIMM, N.B.; JOHNSON, S.L.; MCDOWELL, W.H.; MEYER, J.L.; VALETT, H,M,; WEBSTER, J.R.; ARANGO, C.P.; BEAULIEU, J.J.; BERNOT, M.J.; BURGIN, A.J.; CRENSHAW, C.L.; JOHNSON, L.T.; NIEDERLEHNER, B.R.; O'BRIEN, J.M.; POTTER, J.D.; SHEIBLEY, R.W.; SOBOTA, D.J.; THOMAS, S.M. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. **Nature**, v. 452, n. 13, 2008.

NAIMAN R.J.; DUDGEON, D. Global alteration of freshwaters: influences on human and environmental well-being. **Ecological Research**, v. 26, p. 865–873, 2011.

NIKOLOFF, N.; NATALE, G.S.; MARINO, D.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). **Ecotoxicol Environ Saf**, v.100, p. 275–28, 2014.

NIMET, J.; NEVES, M.P.; VIANA, N.P.; AMORIM, J.P.A.; DELARIVA, R.L. Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. **Environ Monit Assess**, v. 192, n. 58, p. 1-13. 2020.

NITSCHKE, P.R.; CARAMORI, P.H.; RICCE, W.S.; PINTO, L.F.D. **Atlas climático do estado do Paraná**. Instituto Agrônômico do Paraná, 210 p. 2019. Disponível em: < http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/AtlasClimaticoPR.pdf>. Acessado em: 10 jun. 20.

PAISANI, J. C.; PONTELLI, M. E; BERTOLDO, E.; BASSO, G. Resultados preliminares da caracterização de seção pedoestratigráfica em Palmas / PR, Simpósio Paranaense de Pós-Graduação em Geografia / Simpgeo, 4, 2009, Marechal Candido Rondon, **Anais...**, Marechal Candido Rondon, 2009, CD-ROM, 10p.

PAISANI, J.C.; PONTELLI, M. E; CALEGARI, M. R. Evolução de bacias de baixa ordem nos 41.000 anos ap – Brasil Meridional. **Mercator**, Fortaleza, v. 11, n. 26, p. 131-148, 2012.

PANTALEÃO, S.M.; ALCANTARA, A.V.; ALVES, J.P.H; SPANÓ, M.A. The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japarutuba River in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, p. 219-224, 2006.

PAPIS, L.; BERNARDINI, G.; GORNATI, R.; PRATI, M. Triadimefon Causes Branchial Arch Malformations in *Xenopus laevis* Embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v.13, n. 4, p.251-255, 2006.

PARRIS, K.M.; LINDENMAYER, D.B. Evidence that creation of a *Pinus radiata* plantation in south-eastern Australia has reduced habitat for frogs. **Acta Oecologica-International Journal of Ecology**, v. 25, p. 93-101, 2004.

PATAR, A.; GIRI, A.; BORO, F.; BHUYAN, K.; SINGHA, U.; GIRI, S. Cadmium pollution and amphibians - studies in tadpoles of *Rana limnocharis*. **Chemosphere**, v.144, p. 1043-1049, 2016.

PATEL, N.; KHAN, M.D.Z.A.; SHAHANE, S.; RAI, D.; CHAUHAN, D.; KANT, C.; CHAUDHARY, V. K. Emerging Pollutants in Aquatic Environment: Source, Effect, and Challenges in Biomonitoring and Bioremediation- A Review. **Pollution**, v. 6, n.1, p. 99-113, 2020.

PAVAN, F.A.; SAMOJEDEN, C.G.; RUTKOSKI, C.F.; FOLADOR, A.; FRÉ, S.P.; MÜLLER, C.; HARTMANN, P.A.; HARTMANN, M.T. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, 2021.

PELUSO, J.; ARONZON, C.M.; ACQUARONI, M.; COLL, C.S.P. Biomarkers of genotoxicity and health status of *Rhinella fernandezae* populations from the lower Paraná River Basin, Argentina. **Ecological Indicators**, v. 117, p. 1-7, 2020b.

PELUSO, J.; ARONZON, C.M.; COLL, C.S.P. Assessment of environmental quality of water bodies next to agricultural areas of Buenos Aires province (Argentina) by means of ecotoxicological studies with *Rhinella arenarum*. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 54, n. 8, p. 655-664, 2019.

- PELUSO, J.; LANUZA, A.F.; COLL, C.S.P.; ARONZON, C.M. Synergistic effects of glyphosate- and 2,4-D-based pesticides mixtures on *Rhinella arenarum* larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, p.1.-11, 2021.
- PELUSO, J.; COLL, C.S.P.; ROJAS, D.E.; CRISTOS, D.; ARONZON, C.M. Ecotoxicological assessment of complex environmental matrices from the lower Parana River basin. **Chemosphere**, v. 305, p. 1-10, 2022.
- PELUSO, J.; ARONZON, C.M. MOLINA, M.C.R.; ROJAS, D.E.; CRISTOS, D.; COLL, C.S.P. Integrated analysis of the quality of water bodies from the lower Parana River basin with different productive uses by physicochemical and biological indicators. **Environmental Pollution** v. 263, p.1-10, 2020a.
- PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CABAGNA, M.C.; ATTADEMO, A.M.; BASSO, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 185-107, 2008.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; ARCAUTE, C.R.; NIKOLOF, N.; DURY, L.; SOLONESKI, S.; NATALE, G.S. LARRAMENDY, M.L. Te genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicol. Environ. Safe**, v.104, p. 120–126, 2014.
- 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.
- PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; NATALE, G.S.; OLIVEIRA, C. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. **Environmental Pollution**, v. 244, p. 733-746, 2019.
- PINEDA, E.; HALFFTER, G. Species diversity and habitat fragmentation: frogs in a tropical montane landscape in Mexico. **Biological Conservation**, v.117, n5, p. 499–508, 2004.
- PIÑÓN-FLORES, M.A.; SUAZO-ORTUÑO, I.; RAMÍREZ-HERREJON, J.P.; MONCAYO-ESTRADA, R.; DEL-VAL, E. Habitat, water quality or geomorphological degradation in the streams: Which is most important for conserving an endemic amphibian of Central Mexico?. **Journal for Nature Conservation**, v. 64, p. 1.-12, 2021.
- PINTO-VIDAL, F.A.; CARVALHO, C.S.; ABDALLA, F.C.; UTSUNOMIYA, H.S.M.; SALLA, R.F.; JONES-COSTA, M. Effects of lithium and selenium in the tail muscle of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) during premetamorphosis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p.1975–1984, 2022.
- POLLO, F.E.; GRENAT, P.R.; OTERO, M.A.; SALAS, N.E.; MARTINO, A.L. Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae*

(Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.133, p. 466–474, 2016.

POLLO, F.E.; GRENAT, P.R.; OTERO, M.A.; BABINI, S.; SALAS, N.E.; MARTINO, A.L. Evaluation in situ of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/ polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems. **Chemosphere**, v. 216, p. 306-312, 2019.

POMBAL, J. P.J.; HADDAD, C. F. B. Estratégias e modos reprodutivos de Anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 45, n.15, p.201-213, 2005.

POUGH, H.F.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 699p. 2003.

PRIETO, Z.; LEON-INCIO, L.; QUIJANO-JARA, C.; FERNANDEZ, R.; POLO-BENITES, E.; VALLEJO- RODRIGUEZ, R.; VILLEGAS-SANCHEZ, L., Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública**, v. 25, p. 51-58, 2008.

RANATUNGE, R.A.A.R.; WIJESINGHE, M.R.; RATNASOORIYA, W.D.; DHARMARATHNE, H.A.S.G.; WIJESEKERA, R.D. Cadmium-induced toxicity on larvae of the common Asian toad *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799): evidence from empirical trials. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 143-146, 2012.

RAY, M.R.; BASU, C.; MUKHERJEE, S.; ROYCHOWDHURY, S.; LAHIRI, T. Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of fire-fighters. **Int J Hum Genet**, v. 5, p. 45–48, 2005.

REID, A.J.; CARLSON, A.K.; CREED, I.F.; ELIASON, E.J.; GELL, P.A.; JOHNSON, P.T.J.; KIDD, K.A.; MACCORMACK, T.J.; OLDEN, J.D.; ORMEROD, S.J.; SMOL, J.P.; TAYLOR, W.W.; TOCKNER, K.; VERMAIRE, J.C.; DUDGEON, D.; COOKE, S.J. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. **Biological Reviews**, v. 94, p. 849–873, 2019.

RIBEIRO, R. DA S.; EGITO, G. T. B. T. DO; HADDAD, C. F. B. Chave de identificação: Anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, 2005.

ROCHA, M.C.; SANTOS, M.B.; ZANELLA, R.; PRESTES, O.D.; GONÇALVES, A.S.; SCHUCHA, A.P. Preserved riparian forest protects endangered forest-specialists amphibian species against the genotoxic impact of sunlight and agrochemicals. **Biological Conservation**, v. 249, 2020.

ROMANOVA, E.B.; SHAPOVALOVA, K.V.; RYABININA, E.S.; GELASHVILI, D.B. Leukocytic Indices and Micronucleus in Erythrocytes as Population Markers of the Immune Status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) Living in Various Biotopic Conditions. **Biology Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1230–1238, 2019.

ROWE, C.L.; HOPKINS, W.A.; CONGDON, J.D. (2002). Ecotoxicological implications of aquatic disposal of coal combustion residues in the United States: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 80, p. 207-276, 2002.

SAMARAKOON, H.M.T.R., PATHIRATNE, A., Survival and cholinesterase activity of Asian common toad (*Duttaphrynus melanostictus*) tadpoles following short term exposure to a carbosulfan based pesticide. **Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences**, v. 22, p. 29-37, 2017.

SAMOJEDEN, C.G.; PAVAN, F.A.; RUTKOSKI, C.F.; FOLADOR, A.; FRÉ, S.P.; MÜLLER, C.; HARTMANN, P.A.; HARTMANN, M. Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). **Nature: Scientific Reports**, v.22, 2022.

SANTOS, F.I.; MIZOBATA, A.A.; SUYAMA, G.A.; CENCI, G.B.; FOLLADOR, F.A.C.; ARRUDA, G. HELLMANN, L.; GOMES, E.M.V.; SCHMITZ, A.P.O.; POKRYWIECKI, J.C.; LINGNAU, R.; MANOSSO, F.C.; POKRYWIECKI, T.S.; DÜSMAN, E. Cytotoxicity and mutagenicity of the waters of the Marrecas River (Paraná, Brazil) to bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 21742–21753, 2021.

SCHMUTZER, A.C.; GRAY, M.J.; BURTON, E.C.; MILLER, D.L. Impacts of cattle on amphibian larvae and the aquatic environment. **Freshwater Biology**, v. 53, p. 2613-2625, 2008.

SCHWARZ, M.S.; DAVIS, D.R.; KERBY, J.L. **An Evaluation of Agricultural Tile Drainage Exposure and Effects to Wetland Species and Habitat Within Madison Wetland Management District, South Dakota**. Final Report to U.S. Fish and Wildlife Service, South Dakota Ecological Services Field Off, 242p. 2018.

SEGALLA, M.V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G.; GARCIA, P.C.A.; GRANT, T.; HADDAD, C.F.B.; SANTANA, D.J.; TOLEDO, L.F.; LANGONE, J.A.; Lista de espécies brasileiras. *Herpetologia Brasileira*, v. 10, n. 1, 2021. Disponível em: < <https://storage.builderall.com/franquias/2/6437879/editor-html/9025935.pdf> >. Acessado em: 15 out. 21.

SERRANO, L.; DÍAZ-PANIAGUA, C.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, C.; FLORENCIO, M.; MARCHAND, M.A.; ROELOFS, J.G.M.; LUCASSEN, E.C.H.E.T. Susceptibility to acidification of groundwater-dependent wetlands affected by water level declines, and potential risk to an early-breeding amphibian species. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 1253–1261, 2016.

SIEVERS, M.; HALE, R.; SWEARER, S.E.; PARRIS, K.M. Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 482-488, 2018.

SIEVERS, M.; HALE, R.; PARRIS, K.M.; MELVIN, S.D.; LANCTÔT, C.M.; SWEARER, S.E. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. **Science of the Total Environment**, v.693. p.1–11, 2019.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; Brasília, DF, 2004.

ŞIŞMAN1, T.; KESKIN, M.Ç. DANE, H.; ADIL, S.; GEYIKOĞLU, F.; ÇOLAK, S. CANPOLAT, E. Marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) as a bioindicator to assess pollution in an agricultural area. **Zoological Society of Pakistan**, v. 53, n. 1, p. 337-349, 2021.

SLABY, S.; MARIN, M.; MARCHAND, G.; LEMIERE, S. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? **Environmental Pollution**, V. 248, p. 478-495, 2019.

SHAIKH, K.; GACHAL, G.S.; MEMON, S.Q.; SHAIKH, M.Y. assessment of environmental issues of amphibian fauna in Taluka Thano Bula Khan (District Jamshoro) Sindh-Pakistan. **International Journal of Conservation Science**, v.7, p. 579-588, 2016.

SMALLING, K.L.; ROWE, J.C.; PEARL, C.A.; IWANOWICZ, L.R.; GIVENS, C.E.; ANDERSON, C.W.; MCCREARY, B.; ADAMS, M.J. Monitoring wetland water quality related to livestock grazing in amphibian habitats. *Environ Monit Assess*, v.193, n. 58, 2021.

SMITH, M.J.; SCHREIBER, E.S.G.; SGROGGIE, M.P.; KOHOUT, M.; OUGH, K.; POTTS, J.; LENNIE, R.; TURNBULL, D.; JIN, C.; CLANCY, T. Associations between anuran tadpoles and salinity in a landscape mosaic of wetlands impacted by secondary salinisation. **Freshwater Biology**, v.52, p. 75–84, 2007.

STEWART, M.M.; WOOLBRIGHT, L.L. Amphibians. In: REAGAN, D.P.; WAIDE, R.B. (Ed.) **The food web of tropical rain forest**. Chicago: The University of Chicago Press, p. 273-320, 1996.

STRAPAZZON, M.C. 2015. **Reflexões acerca das racionalidades em Unidades de Conservação: o caso do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas**. Dissertação de mestrado (Desenvolvimento Regional). Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2015.

STUART, S.N.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; YOUNG, B.E.; RODRIGUES, A.S.L.; FISCHMAN, D.L.; WALLER, R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1103538>>. Acesso em: 05 mar.2020.

SWEENEY, M.R.; THOMPSON, C.M.; POPESCU, V.D.; Sublethal, behavioral, and developmental effects of the neonicotinoid pesticide imidacloprid on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, p.1838–1847, 2021.

- TEGENAWA, A.; SORIALA, G.A.; SAHLE-DEMESSIEB, E.; HANC, C. Characterization of colloid-size copper-based pesticide and its potential ecological implications. **Environ Pollut**, v. 253, p. 278–287, 2019.
- UDROIU, I.; SGURA, A.; VIGNOLI, L.; BOLOGNA, M.A.; D'AMEN, M.; SALVI, D.; RUZZA, A.; ANTOCCIA, A.; TANZARELLA, C. Micronucleus test on *Triturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, 412-417, 2015.
- VAN GASTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomaker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, p. 217-225, 1996.
- VEGA, A.B.; PIÑAR, N.C.; CASTILLO, A.L; DARANAS, B.M. Variación espacio-temporal de la turbidez y calidad en cuerpos de agua marina de uso pesquero, región norcentral de Cuba, 2008-2010: Space-time variation of turbidity and quality in marine water bodies for fishery use, north-central region of Cuban shelf, 2008-2010. **Serie Oceanológica**, n 12, p. 1-12, 2013.
- VITT, L.J.; CALDWELL, J.P., Herpetology. An introductory biology of Amphibians and Reptiles. 4 ed, Elsevier. 757p. 2014.
- VON SPERLING, M. V.; CHERNICHARO, C. A. L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. Vol. 1. IWA Publishing, London, UK, 1496p. 2010.
- VÖRÖSMARTY, C. J.; MCINTYRE, P. B.; GESSNER, M. O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN P.; GLIDDEN S.; BUNN, S.E.; SULLIVAN, C.A.; LIERMANN, C.R.; DAVIES, P.M. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, p. 555 -561, 2010.
- WALDICK, R.C.; FREEDMAN, B.; WASSERSUG, R.J. The consequences for amphibians of the conversion of natural, mixed-species forests to conifer plantations in southern New Brunswick. **Canadian Field-Naturalist**, v.113, n. 3, p. 408-418, 1999.
- WOOD, S.R.; RICHARDSON, J.S. Impact of sediment and nutrient inputs on growth and survival of tadpoles of the Western Toad. **Freshwater Biology**, v.54, p.1120–1134, 2009.
- YU, S.; TANG, S.; MAYER, G.D.; COBB, G.P.; MAUL, J.D. Interactive effects of ultraviolet-B radiation and pesticide exposure on DNA photoadduct accumulation and expression of DNA damage and repair genes in *Xenopus laevis* embryos. **Aquat Toxicol**, v.159, p. 256–266, 2015.
- ZHANG, B.; LI, B.; WANG, Z. Creation of Carbazole-Based Fluorescent Porous Polymers for Recognition and Detection of Various Pesticides in Water. *American Chemical Society*, v. 5, p. 162-170, 2020.
- ZHANG, X.; LUO, Y.; GOH, K.S. Modeling spray drift and runoff-related inputs of pesticides to receiving water. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 48-58, 2018.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Review: Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 135-150, 2008.