UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Rívia Ribeiro Cezar

Efeitos do detergente líquido neutro (alquilbenzeno sulfonato linear - LAS) sobre o desenvolvimento larval de *Physalaemus nattereri* (Anura)

São José do Rio Preto
2024

Rívia Ribeiro Cezar

Efeitos do detergente líquido neutro (alquilbenzeno sulfonato linear - LAS) sobre o desenvolvimento larval de *Physalaemus nattereri* (Anura)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira
Coorientador: Me. Gabriel da Cunha Canevari

São José do Rio Preto
2024

C425e

Cezar, Rívia Ribeiro
Efeitos do detergente líquido neutro (alquilbenzeno sulfonato linear - LAS) sobre o desenvolvimento larval de Physalaemus nattereri (Anura) / Rívia Ribeiro Cezar. -- São José do Rio Preto, 2024
25 f. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Classius de Oliveira
Coorientador: Gabriel da Cunha Canevari

1. Anatomia. 2. Morfologia (animais). 3. Biologia do desenvolvimento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Rívia Ribeiro Cezar

Efeitos do detergente líquido neutro (alquilbenzeno sulfonato linear - LAS) sobre o desenvolvimento larval de *Physalaemus nattereri* (Anura)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Tiago Leite Pezzuti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
25 de junho de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Classius de Oliveira pela oportunidade de realizar meu estágio curricular no Laboratório de Anatomia Comparada e ao Mestre Gabriel da Cunha Canevari por todos os ensinamentos científicos que eu recebi e pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Érica Ribeiro Guimarães e Adalberto Salgado Cezar, por todo o apoio durante todos esses anos de graduação, sem vocês do meu lado nada disso seria possível.

Agradeço as estagiárias do Laboratório de Anatomia Comparada, em especial a Ana Luíza Ferreira e a Rafaela Furlan por toda a ajuda durante os experimentos da minha pesquisa.

Agradeço às minhas amigas e colegas de curso Júlia Helena S. de Carvalho, Ana Laura Maranha Marini e Ana Claudia Aleixo por toda a amizade e parceria, vocês permitiram que meus dias fossem mais felizes durante os últimos anos.

RESUMO

O uso de detergentes contendo o alquilbenzeno sulfonato linear como ingrediente ativo é comum em residências urbanas e indústrias. O descarte de resíduos contendo este produto químico em esgotos é frequentemente realizado em corpos d'água, rios e mares, levando a contaminação de ambientes aquáticos. Anfíbios são um dos grupos de animais que possuem o ambiente aquático como seu habitat natural pois são os únicos vertebrados com ciclo de vida bifásico, estando suscetíveis a contaminação por estes poluentes, principalmente devido ao seu modo de reprodução e suas características fisiológicas. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações do detergente líquido neutro com ingrediente ativo alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de girinos de *Physalaemus nattereri*. Para isso foram utilizados 180 girinos expostos ao detergente líquido (LAS), durante o período de 45 dias, em cinco concentrações (0,005 $ml/^{-1}$; 0,025 ml/L^{-1}; 0,05 ml/L^{-1}; 0,25 ml/L^{-1} e 0,5ml/L^{-1}). Os resultados demonstraram que o detergente líquido provoca um efeito negativo na sobrevivência de girinos durante o desenvolvimento larval, além de causar uma diminuição do comprimento rostro-cloacal dos indivíduos recém metamorfoseados ,não causando alterações nos demais parâmetros analisados. Dessa forma, conclui-se que a exposição de girinos de *Physalaemus nattereri* ao detergente com ingrediente ativo LAS provoca resultados negativos na sua morfologia e na sua sobrevivência.

Palavras–chave: Anfíbios. Girinos. Surfactantes. Mortalidade. Metamorfose. Contaminantes.

ABSTRACT

The use of detergents containing linear alkylbenzene sulfonate as an active ingredient is common in urban homes and industries. The disposal of waste containing this chemical product in sewage is often carried out in bodies of water, rivers and seas, leading to contamination of aquatic environments. Amphibians are one of the groups of animals that have the aquatic environment as their natural habitat as they are the only vertebrates with a two-phase life cycle, being susceptible to contamination by these pollutants, mainly due to their mode of reproduction and their physiological characteristics. The present study aimed to evaluate the effects of different concentrations of neutral liquid detergent with active ingredient linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the survival and development of Physalaemus nattereri tadpoles. For this, 180 tadpoles were used exposed to liquid detergent (LAS), during a period of 45 days, in five concentrations (0.005 ml/-1; 0.025 ml/L-1; 0.05 ml/L-1; 0.25 ml/L-1 and 0.5ml/L-1). The results demonstrated that liquid detergent has a negative effect on the survival of tadpoles during larval development, in addition to causing a decrease in the rostro-vent length of newly metamorphosed individuals, without causing changes in the other parameters analyzed. Therefore, it is concluded that the exposure of Physalaemus nattereri tadpoles to detergent with the active ingredient LAS causes negative results in their morphology and survival.

Keywords: Amphibians. Tadpoles. Surfactants. Mortality. Metamorphosis. Contaminants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Girino de *Physalaemus nattereri* no estádio 29 (Gosner, 1960) fixado em formol. 12

Figura 2 - Desenho experimental ilustrando a distribuição dos animais em cada grupo. (Controle, C1: 0,005 ml/$^{-1}$, C2: 0,025 ml/L^{-1}, C3: 0,05 ml/L^{-1}, C4: 0,25 ml/L^{-1} e C5: 0,5ml/L^{-1}) 14

Figura 3 - Gráfico de porcentagem da taxa de mortalidade de girinos dos grupos experimentais expostos ao detergente líquido. (*) = p<0,05. 16

Figura 4 - Comprimento rostro-cloacal (CRC) de *P. nattereri* recém-metamorfoseados expostos ao detergente líquido nas concentrações 0,005 ml/L^{-1} e 0,025 ml/L^{-1} em comparação ao grupo controle (0,00ml/L). (*) = p<0,05. 17

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	10
2	**OBJETIVO**	11
2.1	**Objetivo geral**	11
2.2	**Objetivos específicos**	12
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	12
3.1	**Modelo animal**	12
3.2	**Coleta e aclimatação**	13
3.3	**Exposição ao detergente**	13
3.4	**Análises**	15
3.4.1	Tempo de metamorfose e mortalidade	15
3.4.2	Biometria	15
3.4	**Análises estatísticas**	15
4	**RESULTADOS**	16
4.1	**Tempo de metamorfose e mortalidade**	16
4.2	**Biometria**	17
5	**DISCUSSÃO**	17
5.1	**Tempo de metamorfose e mortalidade**	17
5.2	**Biometria**	20
6	**CONCLUSÃO**	21
	REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 80, os anfíbios, como os anuros, se encontram em um declínio de riqueza em grandes proporções (IUCN, 2024). Atualmente, esses animais se enquadram como a classe de vertebrados com maior risco de extinção, com cerca de 40,7% das espécies ameaçadas, sendo as alterações climáticas e a perda de habitats os principais fatores responsáveis por este processo (Luedke et al., 2023).

Devido ao seu ciclo de vida complexo, o qual envolve uma fase larval aquática e uma fase adulta semi aquática ou terrestre (Duellman; Trueb, 1994), os anuros possuem uma grande dependência de ambientes úmidos e aquáticos, principalmente por conta do seu modo de reprodução com a realização do acasalamento e da postura de ovos próximos a água, e das suas características fisiológicas, pois são animais de tegumento com alta permeabilidade, fator extremamente importante para trocas gasosas e manutenção da temperatura corporal, uma vez que são animais ectotérmicos. (Rossa-Feres et al., 2017). Dessa forma, os anuros estão em constante contato com estressores ambientais, sendo assim, considerados bioindicadores de avaliação de qualidade ambiental, pois são organismos que respondem a mudanças no ambiente, como a presença de poluentes ou alterações nas condições físicas e químicas do habitat, de maneira que suas respostas ajudam a identificar impactos ambientais (Almeida, 2019).

A poluição de ambientes aquáticos ocorre em escala global, onde toneladas de resíduos domésticos, industriais e agrícolas são lançados em corpos d’água, rios e mares, resultando em danos irreversíveis a estes ambientes (Tavares, 2014). O descarte de efluentes em corpos d’água são frequentemente realizados por ser um método barato e eficiente (Priya, 2016), entretanto o descarte indevido nos ambientes aquáticos pode resultar em graves danos aos ecossistemas inseridos nesses locais e às comunidades biológicas que dependem dele (Lopes, 2017).

Dentre os contaminantes, o detergente sintético de uso doméstico é um dos poluentes mais encontrados, sendo uma substância muito utilizada na civilização moderna, principalmente em lavanderias industriais (Giagnorio, 2017). Um dos principais componentes do detergente é o LAS (alquilbenzeno sulfonato linear)

(Barbieri, 2005), um tensoativo de larga produção mundial devido a sua utilização em uma grande porcentagem de detergentes (Bonfim, 2006).

Embora seja considerado um tensoativo biodegradável (Barbieri, 2005), o acúmulo de LAS em ambientes de água doce pode causar diversos problemas para os ecossistemas aquáticos como diminuição da penetração da luz, redução na concentração de alguns componentes vitais para os organismos, como o oxigênio dissolvido por exemplo, além de causar aumento das concentrações de substâncias xenobióticas (Da Silva Coelho; Rocha, 2010). De acordo com o Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo (CETESB, 2022), os esgotos domésticos possuem de 3 a 6 mg/L-1 de detergentes e as indústrias de detergente descarregam cerca de 2000 mg/L-1 de efluentes líquidos de LAS, além de outros tipos de indústrias utilizarem detergentes com função desengraxante.

Os efeitos da contaminação por este poluente em girinos ainda é pouco conhecido em relação aos adultos (Mcdiarmid; Altig, 1999). Devido ao fato de estarem em contato direto com a água em seu estágio larval, os girinos que estão em estágio de desenvolvimento iniciais são mais sensíveis e possuem uma capacidade de ajuste mais baixa ao meio no qual está inserido, muitas vezes não resistindo a intensa atividade metabólica (Seixas Filho et al., 2003), o que pode gerar desvios no desenvolvimento morfológico desses animais e causar anomalias em órgãos como o aparelho bucal, intestino, coração e fígado (Sturza, 2017; Amaral, 2018; Jones-Costa, 2018; Franco-Belussi, 2021).

Em decorrência dos dados apresentados, fica evidente que a liberação de resíduos em ambientes aquáticos contendo detergentes (LAS) pode causar uma contaminação desses locais, afetando os organismos que ali vivem, como os anfíbios anuros, ficando estes organismos suscetíveis a alterações morfológicas, como malformações (anomalias e assimetrias) e redução no nível de sobrevivência.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do detergente líquido neutro, com componente ativo alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), pode causar sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de girinos de *Physalaemus nattereri*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos da exposição ao detergente no tempo de metamorfose em *Physalaemus nattereri*;
- Determinar o efeito do detergente sobre a massa corporal e tamanho rostro-cloacal de indivíduos recém-metamorfoseados.
- Avaliar o efeito letal de diferentes concentrações do contaminante em girinos de *Physalaemus nattereri* durante seu desenvolvimento larval.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Para o presente trabalho, utilizamos girinos da espécie *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) (Figura 1). Esta espécie foi escolhida pois apresenta uma alta distribuição, ocorrendo na região central e na região sudeste do Brasil, no leste da Bolívia e no centro-leste do Paraguai (Frost, 2024). Seu comportamento reprodutivo ocorre próximo a corpos d'água temporários ou permanentes (Freitas; Almeida, 2016), onde estes animais realizam a desova em ninho de espuma na superfície da água (Haddad; Prado, 2005). Durante o seu desenvolvimento, os girinos crescem no ninho e posteriormente completam a sua metamorfose no corpo d'água adjacente (Giaretta *et al*., 2019). Dessa forma, a fase larval fica suscetível a ambientes possivelmente contaminados

Figura 1 - Girino de *Physalaemus nattereri* no estádio 29 (Gosner, 1960) fixado em formol.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2 Coleta e aclimatação

A coleta dos espécimes foi realizada na área rural em corpos d'água temporários no distrito de Talhado, São José do Rio Preto – SP (20°42 '43.0 "S 49°16' 38.1"W). Foram coletadas três desovas distintas da espécie de *Physalaemus nattereri*, visando uma diversidade genética. As desovas foram acondicionadas juntas em uma caixa plástica com capacidade de de 12 litros, a qual foi preenchida com 50% de água do ambiente onde as desovas se encontravam e com 50% de água sem cloro, com aeração constante. Após a eclosão das desovas, os animais foram mantidos nessas condições durante 7 dias com o objetivo de aclimatação às condições laboratoriais, sendo alimentados a cada 48 horas com ração Alcon Basic . A coleta foi aprovada pelo IBAMA/ICMBio (n° 18573-7) e os experimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto (CEUA-IBILCE/UNESP) (Protocolo 258/2024).

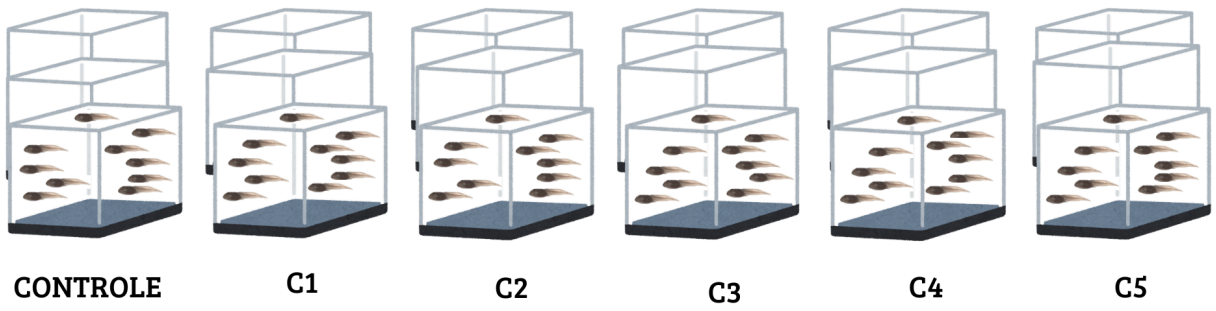
3.3 Exposição ao detergente

Para a realização dos experimentos, inicialmente foram selecionados 180 girinos no estágio 25 Gosner (1960) aleatoriamente para compor os grupos experimentais. Nesse estágio, os girinos apresentam brotos dos membros traseiros começando a aparecer, uma cauda longa e bem desenvolvida para locomoção, e respiram predominantemente através de brânquias, além de apresentarem uma boca com várias fileiras de dentículos e um bico córneo. Seus olhos e narinas são claramente visíveis, e o sistema digestivo é adaptado para uma dieta herbívora. Nessa fase, os girinos estão em um ponto crítico de desenvolvimento, começando a formar estruturas essenciais para a vida terrestre enquanto ainda dependem do ambiente aquático para sobrevivência e alimentação (Gosner, 1960). Os animais selecionados foram divididos em seis grupos experimentais (C0: 0.00 ml/ L^{-1}, C1: 0,005 ml/$^{-1}$, C2: 0,025 ml/L^{-1}, C3: 0,05 ml/L^{-1}, C4: 0,25 ml/L^{-1} e C5: 0,5ml/L^{-1}) compostos por três aquários (triplicatas) com capacidade para seis litros, preenchidos com cinco litros de água sem cloro (controle) e cinco litros de água sem cloro contaminada com detergente líquido Ypê (tratamentos), mantendo uma

proporção de dois animais por litro, totalizando 30 animais por grupo experimental (figura 2). O detergente utilizado (Ypê Clear), além de possuir como princípio ativo o LAS, também é composto por tensoativos aniônicos, coadjuvantes, sequestrantes, espessantes, conservantes, clarificantes, fragrância e veículo. Os tratamentos foram contaminados pelo detergente com o auxílio de micropipetas. Os indivíduos foram mantidos nas condições descritas até terem atingido o estágio 42 (Gosner, 1960), onde posteriormente eram retirados dos aquários e alocados separadamentes em caixas com 100ml de água sem cloro (controle) ou solução de detergente nas devidas concentrações (tratamentos), onde ficavam até atingirem o estágio 46 (Gosner, 1960), para evitar que os animais se afoguem, pois são nesses estágios que os animais iniciam a saída do ambiente aquático para o terrestre.

Durante todo o experimento foram realizadas trocas de água e contaminante dos aquários, alimentação dos animais (Alcon - Basic) e o aferimento dos parâmetros físico-químicos da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade) com medidor multiparâmetro (Akso AK88) a cada 48 horas. O tempo de experimentação foi pré-estabelecido seguindo o protocolo de 45 dias, levando em consideração um período de 50% a mais do tempo de metamorfose habitual da espécie *Physalaemus nattereri*, o qual nas condições laboratoriais ocorre em média 32 dias (Vizotto, 1973). Após esse período, o experimento foi encerrado e os animais que não completaram a metamorfose foram excluídos das análises.

Figura 2- Desenho experimental ilustrando a distribuição dos animais em cada grupo (triplicatas). (Controle, C1: 0,005 ml/$^{-1}$, C2: 0,025 ml/L^{-1}, C3: 0,05 ml/L^{-1}, C4: 0,25 ml/L^{-1} e C5: 0,5ml/L^{-1})



Fonte: Elaborado pelo autor

3.4 Análises

3.4.1 Tempo de metamorfose e mortalidade

Para avaliar a taxa de mortalidade, foram realizados registros da quantidade de indivíduos que vieram a óbito em cada um dos grupos experimentais durante todo o período de experimento, sendo calculada a porcentagem de mortalidade. Com relação ao tempo de metamorfose, foram selecionados dois estágios de Gosner (1960) muito relevantes no processo de metamorfose, o 42, o início do clímax da metamorfose quando ambos os membros traseiros e dianteiros já estão formadas e a transição para o meio semi aquático ou terrestre se inicia e 46, quando a metamorfose se completa. Foi registrado o tempo em dia que os animais levaram para atingir cada um desses estágios, além da diferença de tempo entre estes dois.

3.4.2 Biometria

Os indivíduos que atingiram o estádio 46 (Gosner, 1960) foram eutanasiados em Benzocaína (5g/L) (CONCEA, 2018) e posteriormente pesados individualmente em balança analítica de precisão (Bel Engineering Mark 500 classe II) para a obtenção da massa corpórea utilizada na análise de desenvolvimento. Em sequência, os espécimes foram fixados em formol 10% tamponado por 48 horas e em seguida armazenados em álcool 70%, sendo observados posteriormente em estereomicroscópio (Leica MZ 16), onde foram capturadas imagens para realizar a avaliação do tamanho rostro-cloacal em vista dorsal dos espécimes com o auxílio do programa *Image Pro-Plus 6.0.*

3.5 Análises estatísticas

Os pressupostos de homogeneidade de variância e distribuição dos resíduos foram testados pelo método gráfico com o pacote *sjPlot* (Lüdecke, 2016). Foi utilizado um modelo linear generalizado com distribuição *Poisson* na análise da variação do tempo de metamorfose. Para avaliar os dados obtidos na análise de

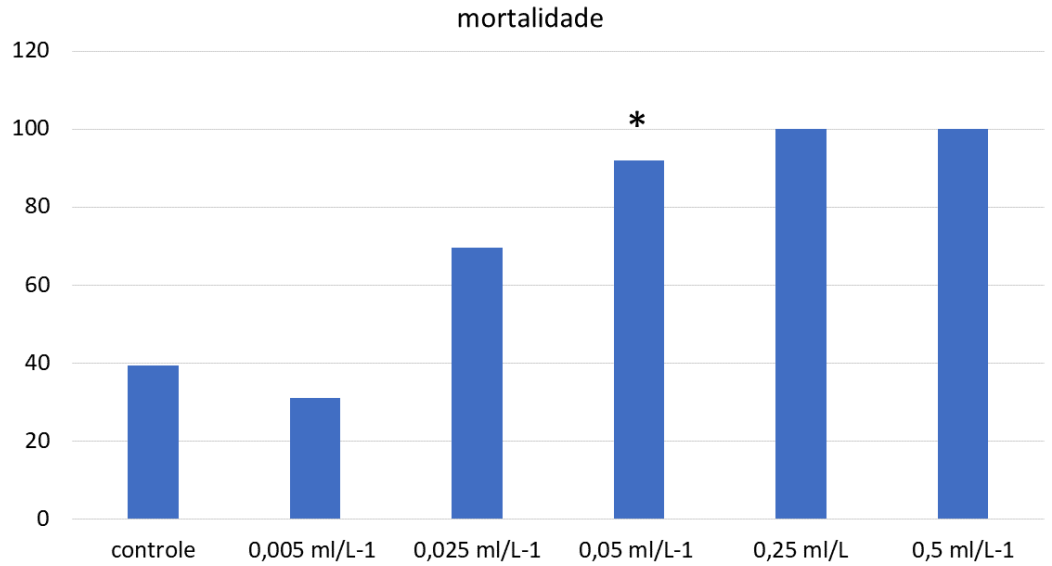
mortalidade foi utilizado uma regressão logística. Já na análise dos dados biométricos, foi utilizado o *Generalized Linear Model* (GLM).

4 RESULTADOS

4.1 Tempo de metamorfose e mortalidade

Na análise de mortalidade, apenas o grupo da concentração 3 (0,05 ml/L^{-1}) mostrou uma diferença significativa com relação ao grupo controle ($p = 0.0072$). Embora a análise estatística utilizada não tenha apontado diferenças significativas nas concentrações 4 e 5, quando avaliamos os valores dessas concentrações em gráfico de porcentagem (figura 3) nota-se que ambas apresentaram 100% de mortalidade, as quais ocorreram nas primeiras 24 horas de experimento. Com relação às análises sobre a metamorfose foi realizada apenas entre o controle e os grupos das concentrações 1 (0,005 ml/L^{-1}) e 2 (0025 ml/L^{-1}), pois foram os únicos tratamentos com o número amostral superior a cinco ($n>5$). Esta demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento e o controle, tanto no estádio 42 quanto no estádio 46. O tempo de diferença entre esses dois estádios também não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos.

Figura 3 - Gráfico de porcentagem da taxa de mortalidade de girinos dos grupos experimentais expostos ao detergente líquido. (*) = $p<0,05$

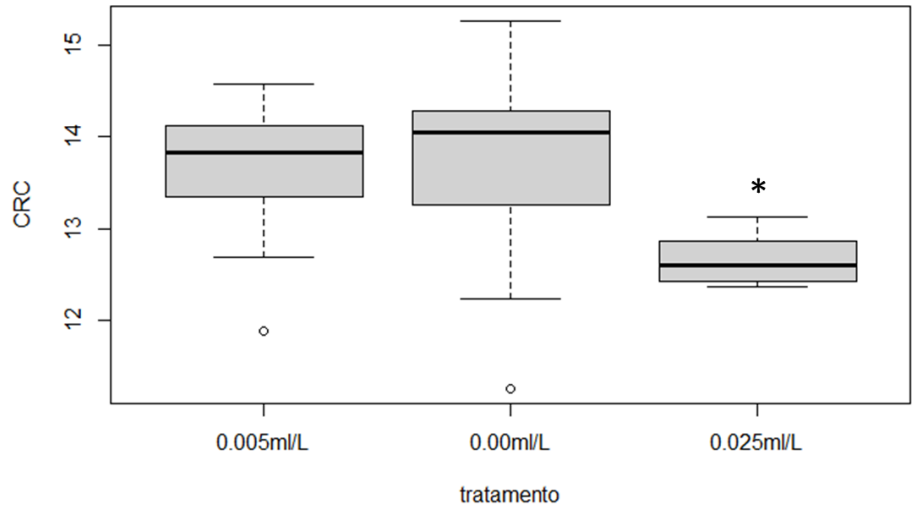


Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Biometria

As análises estatísticas sobre o peso corporal dos indivíduos não demonstraram diferenças em nenhuma das concentrações analisadas. Já a análise sobre o comprimento rostro-cloacal (CRC) apresentou uma diminuição de tamanho apenas entre os animais da concentração 2 (0,025 ml/L^{-1}) com relação ao grupo controle (p = 0,0165) (figura 4). Não foi possível avaliar as demais concentrações (0,05 ml/L^{-1} 0,25 ml/L^{-1} e 0,5 ml/L^{-1}) devido ao número amostral dos animais destes grupos serem inferiores a cinco (n<5).

Figura 4 - Comprimento rostro-cloacal (CRC) de *P. nattereri* recém-metamorfoseados expostos ao detergente líquido nas concentrações 0,005 ml/L^{-1} e 0,025 ml/L^{-1} em comparação ao grupo controle (0,00ml/L). (*) = p<0,05.



Fonte: Elaborado pelo autor

5 DISCUSSÃO

5.1 Tempo de metamorfose e mortalidade

No presente estudo não foram observados efeitos do detergente sobre o tempo de metamorfose em *Physalaemus nattereri.* Estudos realizados com

surfactantes iônicos e não-iônicos que são utilizados nas formulações de detergentes demonstraram que estes compostos podem gerar alterações fisiológicas e morfológicas em diversos grupos animais em ambientes aquáticos (Bjerregaard, Stærmose & Vang, 2001; Da Silva Coelho & Rocha, 2010; Lopes, 2017). Jones-Costa *et al*. (2018), em seu trabalho sobre biomarcadores cardíacos de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos ao surfactante aniônico alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) demonstraram que girinos desta espécie expostos a 5 mg L^{-1} de LAS apresentaram uma diminuição no nível de atividade e sofreram alterações na função cardíaca em diferentes níveis (celular, morfológico e fisiológico). Essas modificações na morfologia e fisiologia cardíaca podem comprometer a aptidão dos girinos ao desviar fontes essenciais de energia, que poderiam ser necessárias para outros processos biológicos, como a metamorfose, por exemplo.

Embora a literatura sobre o efeito do LAS em girinos seja escassa, observamos que trabalhos a respeito do nonilfenol (Mann, 2000; Christensen, 2005; Costa, 2015), outro tipo de surfactante comumente utilizado na indústria química na produção de detergentes, o qual possui uma alta taxa de estrogenicidade e pode gerar diversas alterações em organismos vivos. De acordo com Park *et al*. (2010), a exposição de girinos da espécie *Bombina orientalis* ao nonilfenol apresentou resultados negativos sobre a sobrevivência embrionária e sobre o crescimento dos girinos e metamorfose induzida pelo hormônio T3 nos girinos, indicando que este surfactante apresenta um efeito anti-metamórfico em anfíbios. Assim, o atraso na metamorfose causado pelo nonilfenol pode prolongar o período em que os girinos ficam expostos a contaminantes aquáticos.

Apesar da literatura científica demonstrar estudos que indicam que a exposição à surfactantes aniônicos e não-aniônicos podem afetar o tempo de metamorfose em anuros, os resultados do presente estudo não indicaram que o detergente líquido neutro (LAS) provoque alterações na metamorfose dos girinos *P. nattereri*. Uma possível explicação para este resultado estaria no fato de que a alta taxa de mortalidade pode ter influenciado nos resultados de metamorfose, pois a exposição ao detergente foi letal para uma grande quantidade de girinos, restando apenas os animais mais resistentes ao contaminante, os quais conseguiram se desenvolver normalmente.

Os resultados relacionados à taxa de mortalidade revelaram que o detergente líquido de uso doméstico afeta negativamente a sobrevivência de *P. nattereri*. Embora apenas a concentração 3 (0,05 ml/L^{-1}) tenha apresentado diferenças significativas com relação ao grupo controle na estatística utilizada, quando colocamos os dados de mortalidade em gráfico de porcentagem, é possível observar que as concentrações 0,25 ml/L^{-1} e 0,5 ml/L^{-1} obtiveram um número maior de mortalidade com relação ao controle, apresentando 100% de letalidade nas primeiras 24 horas de exposição ao contaminante. É provável que a análise estatística utilizada não tenha conseguido compreender os dados de forma clara o suficiente para indicar diferença significativa com estas concentrações.

Após a finalização dos experimentos foi possível observar que os girinos das concentrações 0,005 ml/L^{-1} , 0,025 ml/L^{-1} e 0,05 ml/L^{-1} que não atingiram o estágio 42 (Gosner, 1960) e foram eutanasiados apresentaram alterações no aparato bucal, indicando um provável efeito da exposição ao detergente, o que pode ter influenciado nas taxas de mortalidade, pois os girinos teriam dificuldades para se alimentar e consequentemente sobreviver.

Além das alterações na função cardíaca em girinos, como a que foi explicitada anteriormente por Jones-Costa (2018), estudos sobre a contaminação com LAS em diversas espécies de peixes indicam que este tensoativo pode provocar alterações morfológicas em brânquias, fazendo com que a função respiratória do animal seja afetada, influenciando diretamente na sobrevivência destes organismos (Rejeki, Desrina & Mulyana, 2006; Huang & Wang, 1994.). Conforme Ogundele *et al.* (2005) em um estudo realizado em alevinos de *Clarias gariepinus*, a contaminação por detergente contendo LAS na concentração de 24 mg/L foi altamente letal para a espécie, indicando um aumento na mortalidade percentual. Além das altas taxas de mortalidade, foi observado que os alevinos apresentaram hemorragias nas brânquias e distúrbios nervosos como movimento rápido dos opérculos, natação errática e perda de equilíbrio.

Durante a fase aquática da vida de anuros, além da respiração cutânea e pulmonar, os girinos também realizam respiração pelas brânquias, assim como os peixes. No decorrer do seu crescimento e metamorfose, estes animais começam a ter respiração aérea com o desenvolvimento de pulmões (Burggren; West, 1982). Neste contexto, é possível hipotetizar que, assim como nos peixes, o LAS cause lesões no tecido branquial e provoque um quadro de insuficiência respiratória,

resultando na morte destes animais. Estudos futuros devem ser realizados para investigar os efeitos nas brânquias de girinos expostos ao LAS para testar esta hipótese.

5.2 Biometria

O presente trabalho demonstrou que a exposição a detergente com ingrediente ativo LAS não acarreta em alterações na massa corporal de animais expostos. Corroborando com os dados observados, Franco-Belussi *et al*. (2021), em seu trabalho sobre os efeitos de alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) em girinos de *Lithobates catesbeianus*, concluíram que a exposição de anuros a 0,5 mg/L^{-1} em 96 horas não apresenta variação na massa corporal entre os grupos controle e de tratamento, embora tenham constatado que o surfactante cause impactos nos hepatócitos do fígado dos animais expostos a essa concentração.

Com relação ao tamanho rostro-cloacal, observamos uma diminuição no tamanho dos indivíduos expostos à concentração 2 (0,025 ml/L^{-1}) com relação aos animais do grupo controle. A literatura científica sobre a influência de surfactantes no peso e tamanho corpóreo de animais expostos a estes contaminantes atualmente é limitada, com poucos trabalhos na área. Estudos com peixes são mais frequentes, como o trabalho de Kankaya e Atici (2024), onde realizaram um estudo para avaliar a toxicidade de alquilbenzeno sulfonato linear em larvas do peixe *Alburnus tarichi*. Nas análises sobre o comprimento total dos animais não foram constatadas diferenças significativas quando os animais foram expostos às concentrações de 0,0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3,0 mg/L^{-1} no teste agudo e 0,0; 1,2 e 2,4 mg/L^{-1} no teste crônico.

A divergência entre os resultados do presente estudo e o trabalho de Kankaya e Atici (2024) pode ser devido a natureza dos animais utilizados nos estudos, pois são de grupos diferentes. Dessa forma, as respostas à contaminação por LAS podem ser diferentes em peixes e em anfíbios. Além disso, existe uma diferença nos produtos utilizados na contaminação, pois neste estudo utilizamos o detergente líquido de uso doméstico de forma bruta, sem realizar a separação das moléculas de LAS presentes no detergente, ao contrário do trabalho de Kankaya e Atici (2024), que utiliza o LAS na forma pura. Dessa forma, é possível que os girinos de *P. nattereri* expostos ao detergente possam ter sofrido influência de outros

componentes do detergente. Sendo assim, a realização de futuros experimentos sobre o efeito de detergentes no crescimento de girinos são necessários para confirmar as hipóteses.

6 CONCLUSÃO

Nas condições analisadas, o detergente líquido provocou um efeito negativo sobre a sobrevivência e apresentou influência no tamanho corpóreo, acarretando em diminuição do tamanho rostro-cloacal durante o desenvolvimento larval de *Physalaemus nattereri*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Priscilla Rennó; RODRIGUES, Marcos Vinicius; IMPERADOR, Adriana Maria. Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos de formulado comercial com princípio ativo glifosato em girinos de Physalaemus cuvieri (Anura, Leptodactylidae) e Rhinella icterica (Anura, Bufonidae). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, p. 1115-1125, 2019. DOI: 10.1590/S1413-41522019166886

AMARAL, Diogo Ferreira do. Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em girinos de rã touro (lithobates catesbeianus) expostos à abamectina. 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Urutaí, Urutaí, 2018. Disponível em: https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/204. Acesso em: 2 de junho de 2024.

BARBIERI, Edison. Efeito do LAS-C12 (dodecil benzeno sulfonato de sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da tainha (Mugil platanus). **Atlântica (Rio Grande)**, v. 27, n. 1, p. 49-57, 2005.

BONFIM, Jefferson H. Remoção de surfactantes (LAS) no tratamento anaeróbio de esgotos domésticos. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2006. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/5515. Acesso em: 26 de maio de 2024.

BURGGREN, Warren W.; WEST, Nigel H. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog Rana catesbeiana. **Respiration physiology**, v. 47, n. 2, p. 151-164, 1982.

BLAUSTEIN, Andrew R. et al. 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, n. 1, p. 108-119, 2011.

BJERREGAARD, Henning F.; STÆRMOSE, S.; VANG, J. Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on ion transport and intracellular calcium in kidney distal epithelial cells (A6). **Toxicology in vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 531-537, 2001.

BROOMHALL, Sara. Measuring chemical impacts on amphibians: ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation. **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 259-285, 2005.

CETESB (2022) Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade de águas interiores do Estado de São Paulo 2022. São Paulo. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/. Acesso em: 28 de maio de 2024

CONCEA, 2018. Ministério da Ciência e Tecnologia, Diretrizes da prática de Eutanásia do. Cons. Nac. Control Exp. Anim. Resolução Normativa n° 37.Seção I. pag. 5. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/resolucao_concea_n_37_de_15022018.html. Acesso em: 27 de maio de 2024.

COSTA, M. F. et al. Biodegradação do surfactante Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio utilizando fungos filamentosos. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2015.

CHRISTENSEN, Jennie R. et al. Effects of nonylphenol on rates of tail resorption and metamorphosis in Rana catesbeiana tadpoles. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 68, n. 7, p. 557-572, 2005.

DA SILVA COELHO, Katiuscia; ROCHA, Odete. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 812-818, 2010.

DUELLMAN, William E.; TRUEB, Linda. **Biology of amphibians**. JHU press, 1994.

FRAKER, Stephanie L.; SMITH, Geoffrey R. Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on Rana pipiens tadpoles. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 19, n. 3, p. 250-256, 2004.

FRANCO-BELUSSI, Lilian et al. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 266, p. 129014, 2021.

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

FROST, Darrel. 2024. Amphibian Species of the World 6.2: an Online Reference. [online]. Disponível em: http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. American Museum of Natural History, New York, USA. Acesso em: 29 de maio de 2024

GIARETTA, Ariovaldo A.; DA SILVA, Wagner R.; FACURE, Kátia G. Oviposition site selection in two basin-digging Leptodactylus Fitzinger, 1826 (Anura). **Tropical zoology**, v. 32, n. 1, p. 10-18, 2019.

GIAGNORIO, Mattia et al. Environmental impacts of detergents and benefits of their recovery in the laundering industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 154, p. 593-601, 2017.

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

HADDAD, Célio FB; PRADO, Cynthia PA. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.

HOCKING, Daniel J.; BABBITT, Kimberly J. Amphibian contributions to ecosystem services. **Herpetological conservation and biology**, 2014.

HUANG, Bao-Quey; WANG, D. Y. Effects of linear alkybenzene sulfonate (LAS) on the respiratory functions of tigerperch (Terapon-jurbua). **Zoo. Stud**, v. 33, n. 3, p. 205-210, 1994.

JONES-COSTA, Monica et al. Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 151, p. 184-190, 2018.

KANKAYA, Ertuğrul; ATICI, Ataman Altuğ. Toxicity of Linear Alkyl Benzene Sulfonate to Tarek (Alburnus tarichi) Larvae. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 30, n. 2, p. 317-324, 2024.

LAM, Paul KS; GRAY, John S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LIMA, Luan Lucas Cardoso et al. Características gerais dos anfíbios anuros e sua biodiversidade. **Diversitas Journal**, v. 4, n. 3, p. 774-789, 2019.

LOPES, João Victor Saraiva Raimondi. Efeitos do uso do detergente doméstico neutro no comportamento e personalidade do guppy Poecilia reticulata (Peters, 1859)(Osteichthyes: Poeciliidae). 2017.

LÜDECKE, Daniel. Package 'sjPlot.'Data visualization for statistics in social science. R package version 1.3. 2016.

LUEDTKE, Jennifer A. et al. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. **Nature**, v. 622, n. 7982, p. 308-314, 2023.

MANN, Reinier Matthew. **Toxicological impact of agricultural surfactants on Australian frogs**. 2000. Tese de Doutorado. Curtin University.

MCDIARMID, Roy W.; ALTIG, Ronald (Ed.). **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. University of Chicago Press, 1999.

PARK, Chan Jin; KANG, Han Seung; GYE, Myung Chan. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3, 5, 3′-triiodothyronine-induced metamorphosis in Bombina orientalis (Amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1292-1300, 2010.

PRESTES, Rosi Maria; VINCENCI, Kelin Luiza. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 1473-1493, 2019.

PRIYA, R. et al. Efficacy of detergent on hepatocyte morphological changes in fish, Tilapia Mossambica. **J Entomol Zool Stud**, v. 4, n. 5, p. 655-658, 2016.

REJEKI, S.; DESRINA, D.; MULYANA, A. R. Chronic Affects of Surfactant Detergent (Linear Alkyl-Benzene Sulfonate/LAS) on the Growth and Survival Rate of Sea Bass (Lates calcalifer Bloch) Larvae. **Journal of Coastal Development**, v. 95, n. 35, p. 496-599, 2006.

ROSSA-FERES, Denise de C. et al. Anfíbios da Mata Atlântica: lista de espécies, histórico dos estudos, biologia e conservação. **Revisões em Zoologia: Mata Atlântica**, v. 1, p. 237-314, 2017.

SEIXAS FILHO, J. T. et al. Efeito de diferentes salinidades da água sobre o desempenho de girinos de Rana catesbeiana (Shaw, 1802). **Augustus**, v. 8, n. 16, p. 14-23, 2003.

STUART, Simon N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

STURZA, Paola Flores. Toxidade aguda e crônica em girinos de Physalaemus gracilis (Anura: Leptodactylidae) expostos à atrazina e tebuconazole. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Erechim, Erechim - RS. Disponível em: https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/1561. Acesso em: 29 de maio de 2024.

TAVARES, Renan Destefano. Avaliação físico-química e ecotoxicológica de efluentes provenientes de estações de tratamento de esgoto. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 1, p. 303-318, 2014.

UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). (2024) IUCN Red List – The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2024. Disponível em: https://www.iucnredlist.org. Acesso em: 31 maio de 2024.

VIZOTTO, Luiz Dino. Aspectos ontogenéticos dos anuros. Caldasia, p. 113-128, 1973.