

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS DE BAURU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KATIENY FERREIRA DE SOUZA

RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EM GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana*
EXPOSTOS AO TEBUCONAZOL EM SISTEMAS DE MESOCOSMOS

Bauru

2025

KATIENY FERREIRA DE SOUZA

RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EM GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana*
EXPOSTOS AO TEBUCONAZOL EM SISTEMAS DE MESOCOSMOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ciências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas sob
orientação da Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas.

Bauru
2025

S729r Souza, Katiemy Ferreira de
Respostas comportamentais em girinos de *Aquarana catesbeiana*
expostos ao tebuconazol em sistemas de mesocosmos / Katiemy
Ferreira de Souza. -- Bauru, 2025
33 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de
Ciências, Bauru

Orientadora: Juliane Silberschmidt Freitas

1. Anfíbios. 2. Contaminação. 3. Fungicidas. 4. Mesocosmos. 5.
Fisiologia comportamental. I. Título.

KATIENY FERREIRA DE SOUZA

RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EM GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana*
EXPOSTOS AO TEBUCONAZOL EM SISTEMAS DE MESOCOSMOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ciências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas sob
orientação da Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas.

Bauru, 05 de dezembro de 2025.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Utsunomia
Faculdade de Ciências – UNESP – Bauru/SP

Profa. Dra. Cristiane Figueiredo Pinho
Faculdade de Ciências – UNESP – Bauru/SP

Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas
Faculdade de Ciências – UNESP – Bauru/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço, com todo o carinho, à minha orientadora Juliane, por sua paciência, incentivo e por ter me guiado com tanta dedicação durante esta caminhada. Sua orientação foi essencial não apenas para o meu desenvolvimento acadêmico, mas também pessoal.

Aos meus colegas do CEPEA, obrigada pela parceria, troca de experiências, companhia e cafés.

Aos meus pais, Andreia e César, minha gratidão mais profunda. Obrigada por cada esforço, por cada renúncia e por todo o amor com que sempre cuidaram de mim. Sei que nada disso seria possível sem vocês, que lutaram para me oferecer uma vida na qual eu pudesse sonhar e me dedicar aos estudos. Cada conquista minha é, antes de tudo, de vocês.

Aos meus avós, Célia e Nivaldo, obrigada por todo o carinho, apoio e pelas palavras sempre cheias de amor e sabedoria.

Ao meu tio, Anderson, que foi a primeira pessoa da nossa família a cursar uma graduação e sempre serviu como inspiração para mim, deixo minha sincera gratidão. Seu caminho abriu portas no meu imaginário e me motivou a acreditar no meu próprio potencial.

Ao meu irmão, Gabriel, deixo também um agradecimento especial, obrigada por sempre acreditar em mim.

Agradeço imensamente aos meus amigos: Julia, Rafaela, Fernanda, Luisa, Murilo, Luiz Candido, Letícia, Laís, Hugo, Felipe, Paulo, Laura, Manuela e Luis Fernando. Vocês tornaram o caminho mais leve e bonito. Sempre vou carregar comigo a marca da presença de vocês na minha vida.

Ao meu namorado, João Vitor, deixo um agradecimento especial. Obrigada por todo o apoio, pela compreensão nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado. Sua presença, seu carinho e sua confiança em mim foram fundamentais.

Agradeço à Unesp, que foi mais que uma universidade, foi um lar, um espaço de crescimento, descobertas e encontros. Levo comigo não apenas o conhecimento, mas todas as vivências que me transformaram ao longo desse tempo.

E por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de Iniciação Científica, que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

A agricultura é considerada um setor fundamental da economia brasileira; entretanto, o alto consumo e uso excessivo de agrotóxicos gera preocupações acerca da contaminação ambiental e dos impactos causados à biodiversidade. Os anfíbios estão entre os animais mais sensíveis à contaminação por agrotóxicos, principalmente durante seus estágios de vida larvais, quando apresentam elevada permeabilidade cutânea. Diversas espécies de anuros brasileiras têm sido registradas em áreas abertas de cultivo em todo país; contudo, pouco ainda é conhecido a respeito da toxicidade da maioria dos produtos agrícolas para esse grupo animal. Uma abordagem eficaz para compreender os efeitos da exposição aos agrotóxicos em sistemas aquáticos é por meio do uso de modelos ecossistêmicos abertos, conhecidos como mesocosmos, os quais consideram oscilações em condições ambientais relevantes, que desempenham papel crucial na dinâmica e estruturação das comunidades. Neste trabalho, os efeitos do fungicida tebuconazol (TBZ) em girinos de *Aquarana catesbeiana* foram avaliados a partir de parâmetros comportamentais associados à atividade de resposta a um predador (frequência de agregação social e de aproximação ao predador), sob concentrações ambientalmente previstas (30 µg/L) e condições representativas de regiões tropicais. Após 7 dias de exposição em mesocosmos, foi observado que os girinos expostos ao TBZ diminuíram a frequência de organização em *cluster* e obtiveram um maior grau de aproximação do predador, quando comparados com o grupo controle. Apesar de não causar mortalidade, o TBZ pode prejudicar respostas biológicas importantes nos girinos, reduzindo a percepção de seus predadores no ambiente. Os efeitos comportamentais causados pelo TBZ podem estar relacionados ao potencial efeito neurotóxico deste fungicida, o qual será avaliado pela atividade da enzima acetilcolinesterase em uma próxima etapa deste trabalho.

Palavras-chave: Anfíbios, contaminação, fungicidas, mesocosmos, fisiologia comportamental.

ABSTRACT

Agriculture is considered a fundamental activity in the Brazilian economy; however, the high consumption and excessive use of pesticides raise concerns on the environmental contamination and the impacts to the biodiversity. Amphibians are among the most sensitive animals to pesticide contamination, especially during their larval life stages, when they exhibit high skin permeability. Several species of Brazilian anurans have been recorded in open agricultural areas throughout the country; nevertheless, knowledge about the effects and toxicity of most agrochemicals on this group remains limited. An effective approach to understanding the effects of pesticide exposure in aquatic systems is through open ecosystem models, referred to as mesocosms, which incorporate fluctuations in relevant environmental conditions that play a crucial role in the dynamics and structuring of communities. In this study, the effects of the fungicide tebuconazole (TBZ) on *Aquarana catesbeiana* tadpoles were evaluated based on behavioral parameters associated with predator response activity (frequency of social aggregation and predator approach), under environmentally predicted concentrations (30 µg/L) and conditions representative of tropical regions. After seven days of exposure in mesocosms, tadpoles exposed to TBZ decreased their frequency of clustering behavior and presented a higher degree of predator approach when compared to the control group. Although TBZ caused no mortality, it may impair important biological responses in tadpoles, reducing their ability to perceive predators in their habitat. The behavioral effects caused by TBZ may be related to its potential neurotoxic action, which will be evaluated through the activity of the enzyme acetylcholinesterase in the next stage of this study.

Keywords: Amphibians; contamination; fungicides; mesocosms; behavioral physiology.

Lista de Figuras

Figura 1 - Girino de <i>Aquarana catesbeiana</i>	05
Figura 2 - Estrutura instalada na CRHEA/USP, onde foram realizados os experimentos de toxicidade com o TBZ em girinos. À direita uma visão superior feita por um drone e à esquerda, uma visão lateral dos mesocosmos parcialmente enterrados e das gaiolas utilizadas... ..	06
Figura 3 - Representação do modelo experimental utilizado para o teste de detecção do predador. As respostas natatórias foram gravadas e posteriormente a malha quadricular foi adicionada para avaliação do comportamento em <i>cluster</i> dos girinos. Para avaliação da frequência de aproximação ao predador a bandeja foi dividida em duas regiões: o círculo tracejado em azul representa a região (a) e o círculo tracejado em vermelho representa a região (b).....	08
Figura 4 - Registros do experimento de avaliação do comportamento anti-predação em laboratório, após exposição ao TBZ em mesocosmos.....	09
Figura 5 - Representação gráfica de agregação social (<i>cluster</i>) de girinos expostos ao TBZ e grupo controle. A presença de * afere relevância estatística ($p < 0,05$).....	11
Figura 6 - Representação gráfica da frequência de aproximação e evitação ao predador de girinos expostos ao TBZ e grupo controle. A presença de * afere relevância estatística ($p < 0,05$).....	11
Figura 7 - Célula contendo núcleo lobado encontrado nas lâminas de eritrócitos de girinos expostos ao TBZ.....	16

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Mortalidade dos girinos nos tratamentos controle e tebuconazol após os 7 dias de período experimental.....	10
---	----

Lista de Abreviações e Siglas

AChE - Acetilcolinesterase

BChE - Butirilcolinesterase

CbE - Carboxilesterase

ChE - Colinesterase

CL50 - Concentração letal para 50% da população

GLA - Glufosinato de amônio

PEC - Concentração Ambiental Prevista

TBZ - Tebuconazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1. Objetivo geral.....	4
3.2. Objetivo específico	4
4. METODOLOGIA	4
4.1. Organismos.....	4
4.2. Caracterização dos contaminantes.....	5
4.3. Exposição em mesocosmos.....	5
4.4. Análise do comportamento anti-predação.....	7
4.5. Quantificação dos agrotóxicos em água.....	9
4.6. Análises estatísticas.....	9
5. RESULTADOS	10
5.1. Dados de mortalidade após exposição em mesocosmos.....	10
5.2. Análise do comportamento de agregação social (<i>cluster</i>) e frequência de aproximação ao predador	10
6. DISCUSSÃO	11
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
8. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	15
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional e o desenvolvimento da sociedade, o aprimoramento da agricultura e da produção de alimentos, buscando atender as necessidades da população, tornou-se imprescindível. Em 1960, o Brasil vivenciou a chamada Revolução Verde, cujo objetivo era aumentar a produção agrícola por meio de incentivos fiscais e financiamento. O avanço tecnológico nos setores produtivos relacionados à agricultura introduziu, neste contexto, o uso de agrotóxicos com o objetivo de controlar pragas agrícolas, resultando em um aumento da produtividade das áreas de cultivo (MENEZES *et al.*, 2021). Atualmente, a agricultura é um pilar essencial da economia brasileira, e o país se consolidou globalmente como um dos maiores produtores de alimentos (JANUÁRIO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022). Como consequência, o consumo nacional de agrotóxicos cresceu substancialmente, colocando o país no ranking dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. De acordo com o relatório emitido pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil foi o país que mais usou agrotóxicos em 2021, aplicando em suas lavouras quantidades de agroquímicos superiores aos da China e os Estados Unidos juntos (KONCHINSKI, 2024). Em 2025, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registrou 365 ingredientes ativos para produção de mais de dois mil produtos formulados (AGROFIT, 2025). Um dos principais problemas associados ao uso excessivo, e muitas vezes indiscriminado, de agrotóxicos, é que grande parte dos produtos aplicados nas lavouras atinge áreas não alvo, como os corpos hídricos nas proximidades, impactando negativamente os organismos silvestres (BOTELHO *et al.*, 2020; MENEZES *et al.*, 2021). O ambiente aquático é mencionado como um dos principais destinos dos agrotóxicos e fertilizantes agrícolas, principalmente devido ao processo de lixiviação e escoamento superficial da água da chuva (HESS *et al.*, 2014). Dentre os diversos integrantes das comunidades aquáticas que podem ser afetados pela presença destes contaminantes em seus habitats estão os anfíbios, animais bastante sensíveis aos xenobióticos durante suas fases de vida larvais devido à elevada permeabilidade cutânea (FREITAS *et al.*, 2019; GIROTTO *et al.*, 2022).

Muitas espécies de anfíbios de regiões tropicais utilizam poças e lagoas temporárias formadas após intensos períodos de chuva para a reprodução (SCHIESARI e CORRÊA, 2016). Estes habitats oferecem condições adequadas para a desova e desenvolvimento dos girinos, além de apresentarem um menor número de predadores aquáticos permanentes, oferecendo assim um ambiente mais seguro para os ovos e as larvas. No entanto, é comum que essas lagoas estejam inseridas em áreas agrícolas ou próximas a elas, favorecendo a contaminação por agrotóxicos, esse problema é agravado pelo baixo volume de água, pela limitada capacidade de

diluição e baixa habilidade de dispersão dos animais (GIROTTO *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2022). A exposição de anfíbios aos agrotóxicos tem sido associada a um aumento na mortalidade de indivíduos e desenvolvimento de uma série de efeitos subletais, como malformações, atraso na metamorfose dos girinos, anormalidades gonadais em adultos, genotoxicidade, alterações comportamentais, entre outros (BLAUSTEIN e KIESECKER, 2002; KLOAS *et al.*, 2009; PELTZER *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2017a,b; MOREIRA *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2022). Atualmente, os anfíbios são o grupo de vertebrados mais ameaçados de extinção do planeta, com cerca de 41% das espécies em situação risco (IUCN, 2024). Neste cenário, a poluição por agrotóxicos é indicada como um fator importante associado ao declínio populacional de muitas espécies (HAYES *et al.*, 2010; FRYDAY e THOMPSON, 2012; AGOSTINI *et al.*, 2020; FERRANTE e FEARNESIDE, 2020).

O Brasil possui a maior riqueza de espécies de anfíbios do mundo, com cerca de 1194 espécies descritas, sendo a maioria delas endêmicas (AMPHIBIAWEB, 2025). No entanto, pouquíssimo ainda é conhecido a respeito da toxicidade da maioria dos ingredientes ativos dos agrotóxicos e suas formulações comerciais para o grupo. Apesar de um considerável crescimento no número de estudos ecotoxicológicos investigando os impactos da agricultura e da exposição aos agrotóxicos nestes animais, especialmente na América Latina, (COSTA *et al.*, 2024), a maioria dos trabalhos utiliza ensaios de exposição laboratoriais controlados, muitas vezes não representativos das áreas de estudo. Embora estes estudos forneçam informações bastante valiosas, é de conhecimento científico que diversos estressores ambientais, tais como temperatura, pH, e taxa de oxigênio dissolvida, podem intensificar a toxicidade desses contaminantes nestes animais (FREITAS *et al.*, 2016, 2017a; 2017b; GROTT *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2022).

Uma alternativa eficaz para analisar as consequências biológicas da exposição aos agrotóxicos em anfíbios é o uso de lagoas artificiais, conhecidas também como mesocosmos, os quais simulam sistemas lênticos de água doce. Estes modelos são considerados mais realistas pois levam em conta as oscilações naturais de fatores abióticos relevantes, proporcionando uma visão mais precisa dos efeitos da exposição a substâncias químicas, em condições que refletem as complexidades e dinâmicas dos ecossistemas aquáticos. Dentre os agrotóxicos de interesse devido às suas ações toxicológicas para organismos não-alvo, destaca-se o tebuconazol (TBZ), um dos fungicidas mais aplicado em lavouras no país e que tem sido comumente encontrado em ambientes aquáticos e solos de todo o mundo (BERNABÒ, *et al.*, 2016; BERNABÒ *et al.*, 2020; WARSNESKI *et al.*, 2024). O TBZ pertence ao grupo químico dos triazóis, com ação

inibitória do citocromo P450 e enzimas dependentes, interferindo na síntese de esteróis essenciais da membrana celular do fungo, prejudicando seu desenvolvimento (BERNABÒ *et al.*, 2020; WARSNESKI *et al.*, 2024). Ele é classificado como muito perigoso ao meio ambiente (classe II) (Agrolink, 2025) e foi descrito atuar como desregulador endócrino em duas espécies de anfíbios (BERNABÒ *et al.*, 2020; WARSNESKI *et al.*, 2024). A exposição ao TBZ, mesmo em concentrações consideradas ambientalmente relevantes, também diminuiu a sobrevivência, alterou o desenvolvimento, induziu malformações e lesões graves no fígado e nos rins, causou alterações na maturação das gônadas e aumentou ocorrência de intersexo em *Hyla intermedia* (BERNABÒ *et al.*, 2016; BERNABÒ *et al.*, 2020). Foram também relatados efeitos como retardo na metamorfose, estresse oxidativo e lesões hepáticas em girinos de *Boana faber* expostos ao fungicida (WARSNESKI *et al.*, 2024). As concentrações de letalidade do tebuconazol são ainda desconhecidas para a maioria das espécies de anfíbios, com registros de CL50 (concentração letal para 50% da população) disponíveis apenas para duas espécies, *Physalaemus cuvieri*, com CL50_{96h} de 0,98 mg/L e *Xenopus tropicalis* com CL50_{48h} de 7,29 mg/L (WRUBLEWSKI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2016). Apesar de diversas evidências científicas apontando os efeitos prejudiciais causados pelo TBZ em anfíbios e outros organismos aquáticos, a ação tóxica deste agrotóxico ainda não é completamente compreendida, principalmente considerando ensaios ecotoxicológicos em sistemas de exposição em semi-campo.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, os anfíbios são o grupo de vertebrados com maior número de espécies ameaçadas no planeta (IUCN, 2024). Entre outros fatores, a poluição ambiental derivada do uso exacerbado de agrotóxicos exerce grande pressão sobre populações de anfíbios, potencialmente acelerando o declínio de muitas espécies, especialmente àquelas residentes ou visitantes de áreas agrícolas. Os anfíbios são altamente sensíveis à ação de contaminantes ambientais e podem ser considerados bioindicadores importantes, devido à sua alta permeabilidade cutânea e por transitarem entre os compartimentos aquáticos e terrestres ao longo de seu ciclo de vida. O declínio de populações de anfíbios pode causar impactos proeminentes a um ecossistema, já que eles desempenham papéis ecológicos cruciais, como o controle de insetos e a dinâmica das relações predador-presa entre diferentes níveis biológicos. Apesar disso, pouco ainda é conhecido sobre a toxicidade de muitos produtos agrícolas para estes animais, principalmente considerando condições de exposição em mesocosmos. Considerando que o Brasil abriga o maior número de espécies de anfíbios do mundo, ao mesmo

tempo em que é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, se torna de suma importância compreender os efeitos desses contaminantes no grupo, em condições que sejam representativas para regiões de clima tropical. Este trabalho é parte de uma iniciativa que visa expandir o conhecimento sobre os efeitos toxicológicos da exposição de anfíbios a agrotóxicos de ampla utilização nacional, considerando concentrações previstas no ambiente. O uso de mesocosmos para a avaliação das consequências biológicas dos agrotóxicos, além de relevante, confere um caráter inovador a este trabalho, já que é escasso o número de equipes mundiais utilizando lagoas artificiais em sistemas de semi-campo para estudos ecotoxicológicos com anfíbios. Ao buscar compreender melhor os impactos das atividades antrópicas na vida silvestre aquática, este estudo visa contribuir para melhores estratégias de preservação de anfíbios no Brasil, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas, ONU (ODS 14, Vida na Água).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral analisar a toxicidade do fungicida TBZ em girinos de *Aquarana catesbeiana*, considerando exposições em mesocosmos e concentrações ambientalmente relevantes e previstas para aplicação em campos agrícolas brasileiros. Foi pretendido compreender, em um cenário representativo de região tropical, os potenciais impactos negativos gerados pela exposição a este fungicida em anfíbios, durante seus estágios larvais.

3.2. Objetivo específico

Neste trabalho, a toxicidade comportamental causada por exposição a uma concentração ambientalmente relevante do TBZ em sistemas ecossistêmicos abertos foi avaliada a partir das análises das respostas de reação a um predador e comportamento social de agregação dos girinos.

4. METODOLOGIA

4.1. Organismos

Para este experimento foram utilizados girinos no estágio 25 de Gosner (Gosner, 1960) da espécie *Aquarana catesbeiana* (Figura 1), considerada modelo experimental em ecotoxicologia para anfíbios, e previamente utilizada em experimentos de exposição em mesocosmos por nosso grupo de pesquisa (FREITAS et al., 2022). Por apresentar girinos de

maior tamanho corporal, o que viabiliza a coleta de tecidos para as análises biológicas, ter fisiologia conhecida, e responder de forma sensível às alterações dos parâmetros ambientais, a espécie foi eleita, neste trabalho, como modelo biológico. Os girinos foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (Caunesp) de Jaboticabal e passaram por um período de aclimação em laboratório antes da exposição.



Figura 1 - Girino de *Aquarana catesbeiana*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2. Caracterização dos contaminantes

O ingrediente ativo utilizado neste estudo foi o tebuconazol em sua formulação comercial, Tebuco 430 SC Notox (430g/L de tebuconazol), o qual é comumente aplicado nos campos agrícolas.

4.3. Exposição em mesocosmos

Para a avaliação das consequências biológicas sobre os anfíbios, os experimentos foram realizados em mesocosmos, os quais representam sistemas lênticos de água doce, análogos a corpos d'água de paisagens brasileiras. A estrutura foi instalada no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) em novembro de 2024, na Universidade de São Paulo (USP), em São Carlos - SP, Brasil, em parceria ao Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA). Cada mesocosmo consistiu em um compartimento de polipropileno de 1515L, 160 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade, os quais foram parcialmente enterrados para evitar superaquecimento da água (Figura 2). Uma camada de sedimento foi inserida (10 cm de profundidade) para cobrir a base do tanque, e então, a água foi posteriormente adicionada a partir do poço artesiano que abastece o CRHEA. Os mesocosmos permaneceram abertos ao acúmulo natural de material externo e à colonização de algas e fauna aquática e semiaquática local, tais como, libélulas, besouros, insetos aquáticos, entre outros. Os girinos de *A. catesbeiana* foram inseridos nos mesocosmos somente após o período de estabilização, dos

quais foram tomadas medidas semanais dos parâmetros pH, condutividade, temperatura, turbidez e oxigênio dissolvido, a partir de uma sonda multiparamétrica YSI ProDSS. Cada tratamento foi representado por três mesocosmos, os quais receberam os mesmos procedimentos experimentais e foram utilizados como réplicas. Três mesocosmos foram destinados ao grupo controle, e não receberam nenhum tipo de tratamento químico. Estes mesocosmos serviram como referência para as análises dos efeitos de exposição ao TBZ. Outros três mesocosmos receberam aplicação única de 30,94 $\mu\text{g/L}$ de TBZ, utilizando a Concentração Ambiental Prevista (PEC), baseada no pior cenário de contaminação para os sistemas aquáticos, considerando ausência de retenção no solo, o diâmetro e a profundidade de cada mesocosmo.

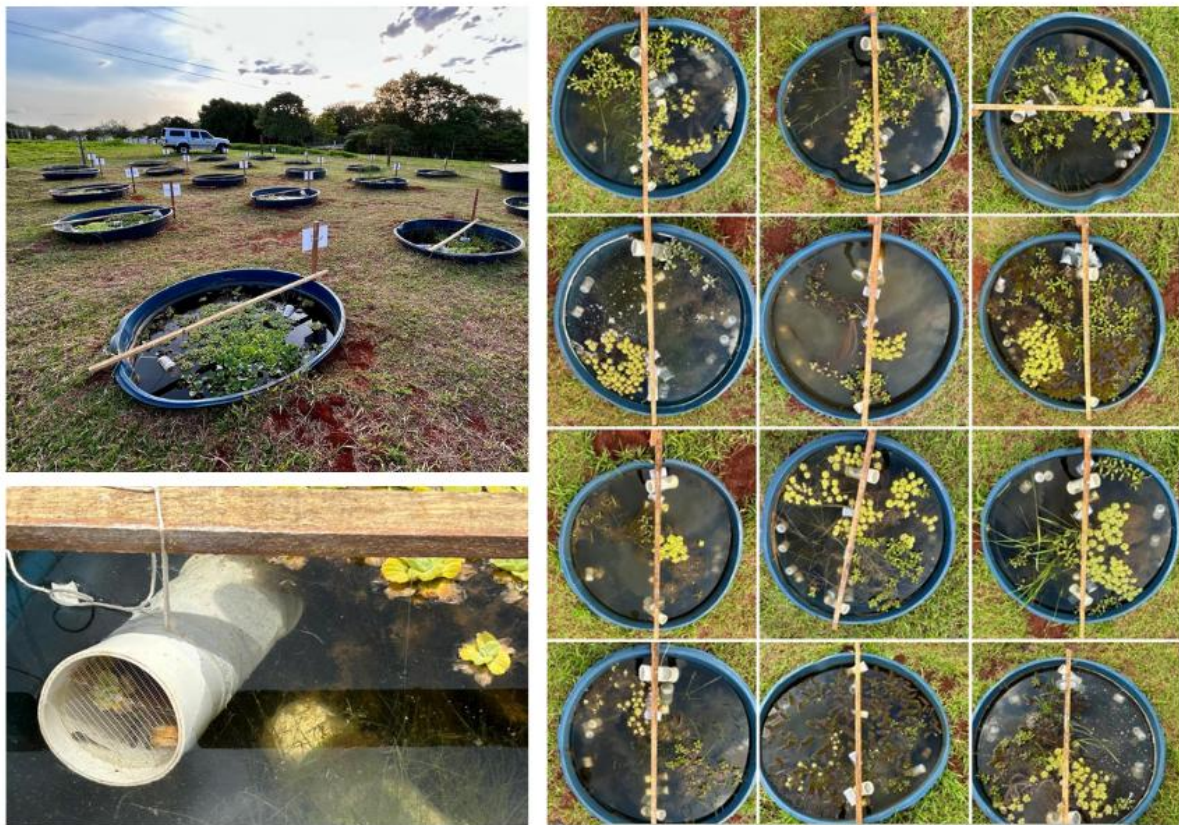


Figura 2 - Estrutura instalada na CRHEA/USP, onde foram realizados os experimentos de toxicidade com o TBZ em girinos. À direita uma visão superior feita por um drone e à esquerda, uma visão lateral dos mesocosmos parcialmente enterrados e das gaiolas utilizadas.

Os girinos foram inseridos nos mesocosmos no mesmo dia da aplicação do contaminante e permaneceram por um período experimental de 7 dias. Para evitar ataques naturais de predadores e facilitar a captura dos organismos ao término do experimento, os girinos permaneceram no interior de gaiolas construídas com tubos de cloreto de polivinila

(PVC) (30 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro), com as laterais e base revestidas por malha de 0,40 mm de espessura, permitindo assim a circulação constante de água e partículas suspensas. As gaiolas foram parcialmente suspensas para viabilizar o acesso dos girinos à superfície da água. Cada mesocosmo recebeu uma gaiola contendo 15 girinos e um ramo de macrófita com matéria orgânica, que serviu de alimento aos animais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal, CEUA, já aprovado pela da Faculdade de Ciências de Bauru (Certificação n. 596/2024). Após o período de 7 dias, os girinos foram removidos e destinados às análises comportamentais, conforme descrito a seguir. Os girinos foram eutanasiados com dose letal de benzocaína (Sigma, >99%).

4.4. Análise do comportamento anti-predação

A avaliação do comportamento anti-predação foi realizada em laboratório, utilizando a metodologia descrita por Collins *et al.* (2011), Parker *et al.* (2014) e Faria *et al.* (2018), com adaptações. Este teste foi aplicado para verificar o comportamento de reação dos girinos ao predador, e foi baseado na avaliação da resposta comportamental defensiva de agregação social dos girinos, bem como na frequência de aproximação ao predador.

Para a avaliação dos efeitos de exposição ao TBZ no comportamento dos girinos, os animais foram retirados dos mesocosmos e levados até o laboratório dentro de recipientes contendo as águas de cada tratamento para a realização das filmagens. Para isso, girinos do grupo controle, bem como àqueles submetidos ao tratamento com TBZ, foram filmados na presença do predador, o qual foi representado por um peixe da espécie *Cyprinus carpio*. Em cada sessão do teste, foram introduzidos simultaneamente 10 girinos de cada mesocosmo em um recipiente redonda de 32,5 cm de diâmetro, contendo água sem cloro, para a gravação do comportamento. Foi concedido 5 min de aclimatação aos girinos antes do início da gravação para adaptação dos mesmos ao recipiente. A gravação foi realizada com o auxílio de uma câmera de celular acoplada a um tripé fotográfico. Após os 5 minutos, o predador foi introduzido a um recipiente dentro de uma gaiola, composta por quatro hastes de plástico e envolvida por malha fina (malha ~18 x 16mm) (Figura 3 e 4). Essa estrutura permite a identificação visual do predador, além de possibilitar a fácil transmissão de sinalizadores químicos para os girinos. A gaiola foi utilizada para evitar a predação dos girinos durante as filmagens e minimizar o efeito adicional da movimentação do predador ao longo do compartimento, já que esta espécie de peixe realiza busca ativa para localização da presa. Logo em seguida, o comportamento dos girinos foi gravado por 5 min (300s) para as posteriores análises. As filmagens foram feitas em triplicata, para cada tratamento.

Para as análises comportamentais, foram capturados *prints* dos vídeos produzidos em intervalos de 10 segundos, totalizando 30 imagens para cada vídeo. Foi aplicada uma malha quadriculada de 8 cm² em cada imagem (Figura 3 e 4), utilizando o software Photoshop e a partir delas, foi avaliado o comportamento de agregação (*cluster*) dos girinos na presença do predador. Para determinar um *index* do comportamento de agregação, foi dividido o número máximo de girinos posicionados em um dado quadrante pelo número total de quadrantes ocupados por todos os animais (COLLINS et al. 2011; PARKER et al. 2014; FARIA et al., 2018).

A frequência de aproximação ao predador foi determinada a partir da delimitação das regiões do compartimento redondo as quais cada girino ocupava em cada *print*. Para isso, o recipiente foi dividido em duas regiões: (a) distante do predador (próximo à borda) e (b) próximo à gaiola do predador (Figura 3). As demarcações foram realizadas para estimar as taxas de (a) evitação ao predador (*avoiding*) e (b) aproximação ao predador (*approaching*). Esta frequência foi utilizada para avaliar a percepção e habilidade de distanciamento do girino em relação ao predador, para cada tratamento.

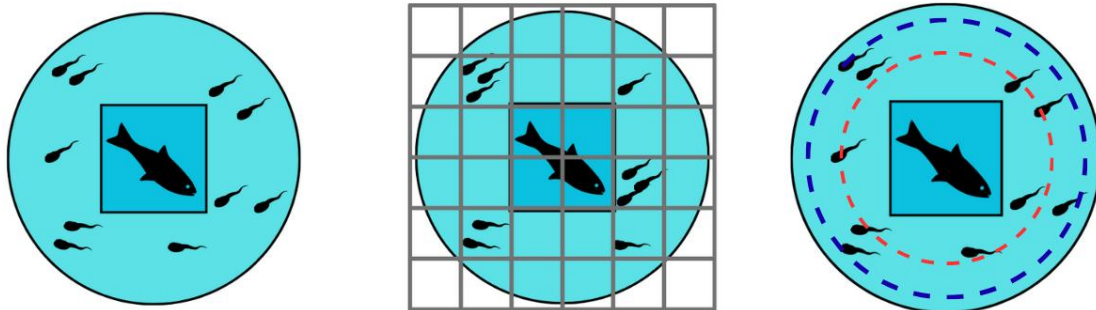


Figura 3 - Representação do modelo experimental utilizado para o teste de detecção do predador. As respostas natatórias foram gravadas e posteriormente a malha quadriculada foi adicionada para avaliação do comportamento em *cluster* dos girinos. Para avaliação da frequência de aproximação ao predador, o recipiente foi dividido em duas regiões: o círculo tracejado em azul representa a região (a) e o círculo tracejado em vermelho representa a região (b).

Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 4 - Registros do experimento de avaliação do comportamento anti-predação em laboratório, após exposição ao TBZ em mesocosmos.

4.5. Quantificação dos agrotóxicos em água

Amostras de água foram coletadas no início e ao término do experimento para quantificar as concentrações de TBZ adicionadas aos mesocosmos e as que permaneceram ao longo do tratamento. Esses procedimentos estão em processo de análise no Laboratório de Química Ambiental coordenado pela Prof. Cassiana Montagner, no Departamento de Química Analítica do IQ-Unicamp, parceira deste projeto. A quantificação dos compostos será realizada utilizando a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS/MS - Agilent Technologies QqQ 1200 e 6410B).

4.6. Análises estatísticas

Para os parâmetros biológicos obtidos, foi verificada a normalidade e a homogeneidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. A média das respostas dos biomarcadores avaliados nos girinos de cada mesocosmo foi calculada para estimar a resposta de cada réplica. Foi utilizado o teste de variância ANOVA One-Way em software STATISTICA, comparando os dados do grupo controle ao do grupo exposto ao TBZ. Valores de $P < 0,05$ foram considerados para atribuir significância estatística entre os grupos.

5. RESULTADOS

5.1. Dados de mortalidade após exposição em mesocosmos

A Tabela 1 exibe a quantidade de girinos que morreram ao longo do período experimental de 7 dias em cada mesocosmo.

Tratamentos/Mortalidade	Vivos	Mortos
Controle 1	15	0
Controle 2	15	0
Controle 3	12	3
TBZ 1	11	4
TBZ 2	15	0
TBZ 3	15	0

Tabela 1 - Mortalidade dos girinos dos grupos controle e tebuconazol após os 7 dias de período experimental.

5.2. Análise do comportamento de agregação social (*cluster*) e frequência de aproximação ao predador

Após o período experimental de 7 dias, os girinos de *A. catesbeiana* expostos ao TBZ apresentaram alteração significativa no comportamento defensivo de agregação social, como observado na Figura 5. Os girinos expostos ao TBZ apresentaram uma diminuição na média de organização em *cluster* ($p= 0,011646$) quando comparados ao grupo controle.

Também foi possível verificar significância estatística ($p= 0,000009$) em relação a frequência de aproximação ao predador (Figura 6). Os girinos do tratamento com TBZ evitaram menos o predador (*avoiding*) do que os girinos do grupo controle, ao passo que os girinos do tratamento com TBZ se aproximaram mais do predador (*approaching*) do que os girinos do grupo controle. Foi possível observar que os girinos do grupo controle apresentaram uma média de aproximação de 4,1, enquanto aqueles expostos ao TBZ se aproximaram em média 5,47 vezes.

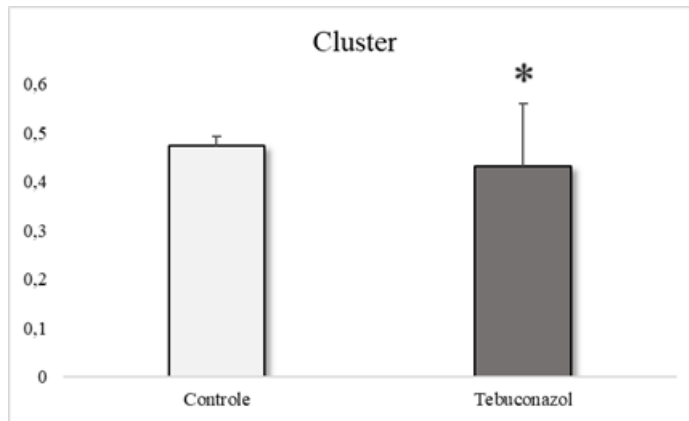


Figura 5 - Representação gráfica de agregação social (*cluster*) de girinos expostos ao TBZ e grupo controle. A presença de * afere relevância estatística ($p < 0,05$).

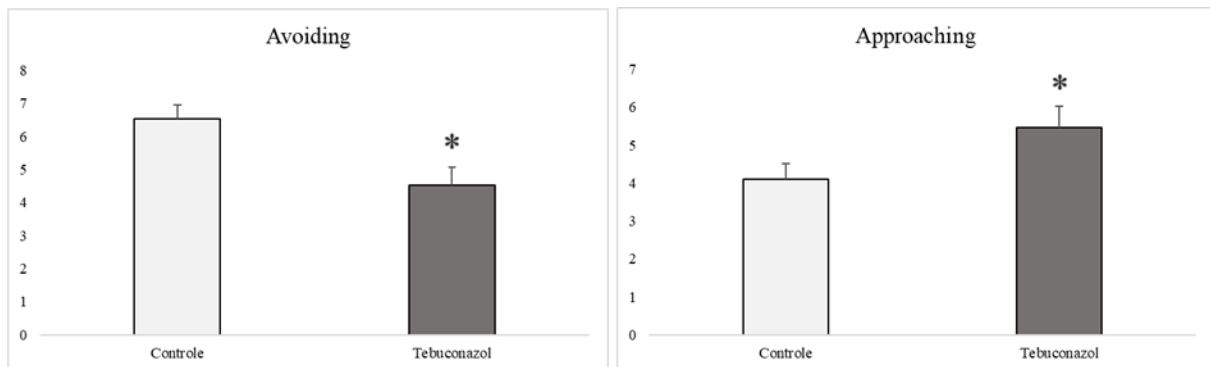


Figura 6 - Representação gráfica da frequência de aproximação e evitação ao predador de girinos expostos ao TBZ e grupo controle. A presença de * afere relevância estatística ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a exposição de girinos de *A. catesbeiana* ao TBZ, sob condições de semi-campo e concentrações ambientalmente relevantes, alterou o comportamento desses animais, prejudicando a habilidade sensorial de defesa comportamental a um potencial predador. Estudos publicados nos últimos anos na literatura científica demonstram que a avaliação comportamental de organismos aquáticos a contaminantes ambientais pode ser considerada uma ferramenta sensível e ecologicamente valiosa na avaliação de efeitos toxicológicos em animais não-alvo (LITTLE e FINGER, 1990; HELLOU, 2010; MELVIN e WILSON, 2013; PETERSON *et al.*, 2017). De acordo com Peterson *et al.* (2017), alterações comportamentais podem prejudicar a aptidão individual dos organismos, ou seja, sua capacidade de sobreviverem e deixarem descendentes, levando por exemplo a um

aumento da mortalidade e redução do sucesso reprodutivo.

Após a avaliação do comportamento anti-predação realizado neste trabalho, que visava analisar a resposta defensiva de agregação social (*cluster*) e a frequência de aproximação ao predador dos animais, foi possível observar que os girinos expostos ao TBZ diminuíram a frequência de organização em *cluster* e tiveram um maior grau de aproximação do predador, quando comparados com o grupo controle. O comportamento de agregação social é frequentemente observado em várias espécies de girinos sob condições de risco à predação (KATZ *et al.*, 1981; SPIELER e LINSENMAIR, 2001; SPIELER, 2003; RODEL e LINSENMAIR, 2010; CASILLAS-BARRAGÁN *et al.*, 2016; ARAÚJO e MALAFAIA, 2020) e pode ser estimulado pela detecção visual e/ou de sinais químicos emitidos pelo potencial predador no ambiente (SPIELER, 2003; CASILLAS-BARRAGÁN *et al.*, 2016). A agregação social pode ser vantajosa por reduzir o risco de predação, aumentar a habilidade de vigilância e a eficiência da proteção do grupo, além de diminuir a probabilidade de detecção individual devido ao efeito de diluição (DAVIES *et al.*, 2012). Esse comportamento também pode favorecer a aquisição de alimento, promovendo a ressuspensão de sedimentos e alimentos presentes no fundo de ambientes aquáticos durante o forrageamento (D'HEURSEL e HADDAD, 2002). Considerando o exposto, bem como os resultados obtidos neste estudo, verifica-se que a redução da resposta anti-predatória induzida pelo TBZ pode representar uma ameaça significativa à sobrevivência dos girinos em seus ambientes naturais.

Evidências indicam que o TBZ é também capaz de induzir alterações comportamentais em outros vertebrados aquáticos, como o peixe-zebra *Danio rerio*. Altenhofen *et al.* (2017) demonstrou em seu estudo que a exposição a esse fungicida reduziu a capacidade exploratória das larvas e diminuiu tanto a distância percorrida quanto a velocidade média dos adultos. Além disso, foi observado uma redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em larvas e adultos de *D. rerio*. A AChE é uma importante enzima na degradação da acetilcolina, neurotransmissor com atividade crucial para a iniciação da contração muscular. Quando a AChE é inibida, o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica pode resultar em hiperestimulação das fibras esqueléticas e, conseqüentemente, desregulações comportamentais do indivíduo (SOREQ e SEIDMAN, 2001; DVIR *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2022).

Um estudo prévio realizado com uma espécie de girinos brasileira, *Physalaemus cuvieri* (Wrubleswski *et al.*, 2018) observou que o TBZ induziu toxicidade aguda, mas não afetou a atividade de natação dos animais (tempo total de movimento e episódios de natação). Já outros dois agrotóxicos testados nesta mesma espécie, o herbicida atrazina e o inseticida cipermetrina,

causaram uma redução na atividade natatória dos girinos. O TBZ também mostrou induzir uma redução na mobilidade geral de embriões de *Xenopus laevis*, uma espécie de anfíbio modelo usualmente aplicada em estudo ecotoxicológicos na Europa, em artigo recentemente publicado, além de causar anormalidades morfológicas durante o desenvolvimento neural e cardíaco (IHLE *et al.*, 2025).

Apesar da carência de estudos na literatura sobre os efeitos comportamentais do TBZ em anfíbios, bem como das vias de ação bioquímicas e fisiológicas que podem induzir estes efeitos, outros contaminantes já testados demonstraram a capacidade de alterar o comportamento desses animais, o que coloca em debate sobre os efeitos subletais induzidos por exposição aos agrotóxicos nestes animais. Por exemplo, a exposição ao herbicida 2,4-D prejudicou a velocidade de natação de girinos de *A. catesbeiana* e também a sua capacidade de detectar e evitar concentrações mais elevadas do contaminante no ambiente (FREITAS *et al.*, 2019). Em girinos de *Leptodactylus luctator* e *P. cuvieri*, o inseticida imidacloprido também induziu alterações comportamentais, reduzindo a atividade locomotora dos girinos (SAMOJEDEN *et al.*, 2022).

Lajmanovich *et al.* (2018) demonstrou em seus estudos que o agrotóxico TRISADA® (composto por deltametrina, tetrametrina e piperonil butóxido) causou inibição das enzimas AChE e carboxilesterase (CbE), além da redução na atividade natatória dos girinos de *Rhinella arenarum*. Já girinos de *Hypsiboas pulchellus* expostas ao herbicida glufosinato de amônio (GLA), causou inibição das enzimas AChE e butirilcolinesterase (BChE) e um aumento da velocidade e distância de nado dos animais (PELTZER *et al.*, 2013). Além dos agrotóxicos, outros contaminantes ambientais já evidenciaram causar alterações comportamentais em anfíbios durante suas fases larvais. Girinos de *P. cuvieri* expostos a microplásticos de polietileno apresentaram redução na distância percorrida e na velocidade de natação, além do aumento do índice de ansiedade, *déficit* no comportamento de agregação social e maior grau de aproximação quando expostos a um predador (ARAÚJO e MALAFAIA, 2020). Os autores não estabeleceram correlações diretas entre a toxicidade comportamental observada e alterações fisiológicas, entretanto, sugerem que os efeitos comportamentais podem estar relacionados à inibição de colinesterase (ChE), à alteração de níveis de neurotransmissores cerebrais ou à interferência no metabolismo energético (ARAÚJO e MALAFAIA, 2020). Freitas *et al.* (2019) relatou, por exemplo, em seu estudo com exposição de girinos ao 2,4-D, que diminuições na eficiência comportamental dos animais tratados estavam atreladas às reduções em conteúdos energéticos, como níveis de triglicerídeos, além de diminuições nas

taxas de respiração dos animais. Segundo Scott e Sloman (2004), alterações comportamentais podem estar relacionadas a processos fisiológicos diversos, como a inibição de enzimas ChE, níveis alterados de neurotransmissores cerebrais, privação sensorial e níveis prejudicados de hormônios gonadais ou tireoidianos.

O presente trabalho está associado a um projeto mais amplo coordenado pela orientadora deste projeto, o qual visa compreender os efeitos de exposição a diversos agrotóxicos de uso relevante no Brasil em anfíbios, utilizando mesocosmos como modelos de estudo e concentrações ambientalmente relevantes. Em próxima etapa de execução deste projeto, avaliaremos a atividade da enzima AChE em girinos expostos ao TBZ, a fim de compreender o potencial efeito neurotóxico deste fungicida, associando-o às alterações comportamentais aqui observadas. Reforça-se a necessidade de novos estudos acerca do tema, sugerindo como pesquisas futuras: efeito combinado de agrotóxicos sobre anfíbios, relação entre alterações comportamentais e possíveis alterações fisiológicas causadas por contaminantes ambientais e também o uso de espécies nativas representativas de regiões tropicais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade comportamental do fungicida TBZ em girinos de *A. catesbeiana*, sob condições de semi-campo e em concentrações ambientalmente previstas no ambiente. A análise do comportamento anti-predação foi baseada na resposta defensiva de agregação social dos girinos e na frequência de aproximação ao predador. Os resultados obtidos demonstraram que os girinos expostos ao TBZ apresentaram redução na frequência de organização em *clusters* e maior aproximação ao predador. Esses achados indicam que, embora o TBZ não tenha causado mortalidade, apresenta toxicidade comportamental mesmo sob concentrações ambientais. Indicamos, a partir de nossos resultados, junto a resultados já disponíveis em literatura, que o fungicida pode comprometer respostas biológicas importantes, interferindo na percepção e reconhecimento de predadores no ambiente. Esse déficit nas respostas anti-predação representa um risco potencial à sobrevivência dos animais em condições naturais, uma vez que dificulta a fuga de predadores e a eficiência na obtenção de alimento.

O presente trabalho foi o primeiro a atestar toxicidade comportamental do TBZ em anfíbios, relacionado a aspectos de defesa contra um predador, representando um achado

relevante para a literatura científica. Como o TBZ age interferindo na síntese de esteróis essenciais da membrana celular do fungo e impedindo seu desenvolvimento, não era esperado que o fungicida causasse alterações comportamentais em organismos não-alvos, pois este mecanismo não compõe ação específica do fungicida. Essas alterações são mais esperadas quando os organismos são expostos aos inseticidas, os quais agem no sistema nervoso central, bloqueando, por exemplo, vias neuronais nicotinérgica (ARCAUTE *et al.*, 2014).

Atualmente os anfíbios são o grupo de vertebrados mais ameaçados de extinção no mundo. Entre os fatores que contribuem para esse declínio populacional está o avanço da agricultura e o uso exacerbado de agrotóxicos. Dessa forma, o presente estudo visa contribuir para melhores estratégias de preservação da biodiversidade de anfíbios no Brasil e também enfatiza a necessidade de novas investigações sobre o tema.

8. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O presente trabalho faz parte do projeto de Iniciação Científica intitulado “Avaliação dos efeitos genotóxicos, fisiológicos e comportamentais em girinos expostos ao tebuconazol em mesocosmos” da autora, que está em desenvolvimento e vigência pela FAPESP (2025/02228-6). Ao longo do ano, outras atividades relacionadas ao tema foram desenvolvidas:

- Apresentação do trabalho intitulado “Comportamento defensivo de *cluster* em girinos de *Aquarana catesbeiana* expostos ao fungicida tebuconazol” no XXXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - FC/Bauru.
- Apresentação do trabalho intitulado “Respostas comportamentais em girinos de *Aquarana catesbeiana* expostos ao tebuconazol em mesocosmos” no VII Congresso de Biologia da Unesp - Campus de Bauru.
- Participação no II Workshop “A Contribuição da Ecotoxicologia para Avaliação dos Efeitos de Microplásticos e Agrotóxicos em Ecossistemas Aquáticos e Terrestres: Síntese do Conhecimento e Perspectivas Futuras” em São Carlos - SP.
- Avaliação de micronúcleos e anormalidades eritrocitárias: as lâminas de esfregaço de sangue de girinos expostos ao TBZ foram coradas, fotografadas e estão em processo de análise (Figura 7).



Figura 7 - Célula contendo núcleo lobado encontrado nas lâminas de eritrócitos de girinos expostos ao TBZ.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, M. G. *et al.* Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. **Biol Conserv**, v. 241, 108355, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355. Acesso em: 20 jan. 2025.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Relatório Consolidado de Ingredientes Ativos, 2025. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 30 jan. 2025.

AGROLINK. Tebuconazole CCAB 200 EC. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/tebuconazole-ccab-200-ec_8693.html. Acesso em: 7 jan. 2025. Acesso em: 30 jan. 2025.

ALTENHOFEN, S. *et al.* Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 483-490, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.029>. Acesso em: 05 nov. 2025.

AMPHIBIAWEB. University of California, Berkeley, CA, EUA. 2025. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 06 jan. 2025.

ARAÚJO, A. P. C.; MALAFAIA, G. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). **J Hazard Mater**, v. 391, 122214, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122214>. Acesso em: 03 nov. 2025.

ARCAUTE, C. R. *et al.* Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecol Indic**, v. 45, p. 632-639, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.034>. Acesso em: 02 nov. 2025.

ARCAUTE, C. R. *et al.* Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban® 48E formulation of chlorpyrifos. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 2338-2348, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0990-4>. Acesso em: 31 jan. 2025.

BERNABÒ, I. *et al.* Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). **Aquat Toxicol**, v. 172, p. 56-66, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.017>. Acesso em: 22 jan. 2025.

BERNABÒ, I. *et al.* Tissues injury and pathological changes in *Hyla intermedia* juveniles after chronic larval exposure to tebuconazole. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 205, 111367, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111367>. Acesso em: 22 jan. 2025.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecol Lett**, v. 5, n. 4, p. 597-608, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>. Acesso em: 19 jan. 2025.

BOSCH, B. *et al.* Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. **J Toxicol Environ Health**, v. 3, p. 155-163, jun. 2011. Acesso em: 29 jan. 2025.

BOTELHO, M. G. L. *et al.* Agrotóxicos na agricultura: agentes de danos ambientais e a busca pela agricultura sustentável. **Res Soc Dev**, v. 9, n. 8, e396985806, jul. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5806>. Acesso em: 10 jan. 2025.

CASILLAS-BARRAGÁN, I. *et al.* Perceived predation risk decreases movement and increases aggregation of Amazon milk frog (Anura, Hylidae) tadpoles throughout ontogeny. **Hydrobiologia**, v. 765, p. 379-386, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2433-8>. Acesso em: 03 nov. 2025.

COLLINS, L.M. *et al.* Clustering and synchrony in laying hens: the effect of environmental resources on social dynamics. **Appl Anim Behav Sci**, v. 129, p. 43-53, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.10.007>. Acesso em: 03 fev. 2025.

COSTA, Renan Nunes *et al.* How pollutants are affecting amphibian tadpoles: relationship with anthropogenic pollutants and perspectives for the future. *In*: ALMEIDA, Eduardo Alves de; FREITAS, Juliane Silberschmidt. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2024. p. 1-26.

DAVIES, N. B. *et al.* **An Introduction to Behavioural Ecology**. 4. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2012. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=G9mXO5asWi8C&oi=fnd&pg=PR10&ots=qRjZg02ccQ&sig=Rt-XoRBVse60S3kFrPcpMtbHFd4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 05 nov. 2025.

D'HEURSEL, A.; HADDAD, C. F. B. Schooling and swimming behaviors of *Hyla semilineata* tadpoles (Anura, Hylidae). **Iheringia Sér Zool**, v. 92, n. 1, p. 99-104, 2002. DOI: 10.1590/s0073-47212002000100010. Acesso em: 05 nov. 2025.

DVIR, H. *et al.* Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chem Biol Interact**, v. 187, p. 10-22, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>. Acesso em: 14 nov. 2025.

FARIA, D.B.G. *et al.* Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations. **Sci Total Environ**, v. 636, p. 1553–1564, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.293>. Acesso em: 03 fev. 2025.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, p. 81-95, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8). Acesso em: 30 jan. 2025.

FERRANTE, L.; FEARNSTIDE, P.M. 2020. Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on Amazonian frogs. **Acta Amaz**, v. 50, n. 4, p. 363-366, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000562>. Acesso em: 18 jan. 2025.

FREITAS, J. S. *et al.* Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicol Environm Safe**, v. 182, 109446, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>. Acesso em: 19 dez. 2024.

FREITAS, J. S. *et al.* Influence of temperature on the thyroidogenic effects of diuron and its metabolite 3,4-DCA in tadpoles of the american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Environ Sci Technol**, v. 50, n. 22, p. 13095–13104, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.6b04076. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04076>. Acesso em: 20 dez. 2024.

FREITAS, J. S. *et al.* Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environm Poll**, v. 299, 118894, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118894>. Acesso em: 19 dez. 2024.

FREITAS, J. S. *et al.* Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. **Chemosphere**, v. 185, p. 548-562, 2017b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061>. Acesso em: 20 dez. 2024.

FREITAS, J. S.; TERESA, F. B.; ALMEIDA, E. A. Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®). **Comparat Biochem and Physiol, Part C**, v. 197, p. 32–44, 2017a. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S153204561730090X?via%3Dihub>. Acesso em: 21 dez. 2024.

FRYDAY, S.; THOMPSON, H. Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. **EFSA J**, v. 9, p. 343, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2012.EN-343>. Acesso em: 20 jan. 2025.

GIROTTO, L. *et al.* Using mesocosms to evaluate the impacts of pasture intensification and pasture-sugarcane conversion on tadpoles in Brazil. **Environ Sci Pollut Res**, v. 30, p. 21010–21024, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23691-5>. Acesso em: 19 dez. 2024.

GOSNER, K. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, p. 183–190, 1960. Disponível em: <https://utkaluniversity.ac.in/wp-content/uploads/2022/06/Tadpole-stages-gosner-stage-1960-1.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2025.

GROTT, *et al.* Influence of temperature on biomarker responses and histology of the liver of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802) exposed to the herbicide Tebuthiuron. **Sci Total Environ**. v. 1, 771:144971, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.144971. Acesso em: 29 out. 2025.

HAYES, T. B. *et al.* The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **J Exp Biol**, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>. Acesso em: 20 jan. 2025.

HEDDLE, J.A. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 123, p. 61–118, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90047-7). Acesso em 29 jan. 2025.

HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 18, p. 1-11, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>. Acesso em: 04 nov. 2025.

HESS, T. *et al.* Understanding the impact of crop and food production on the water environment-using sugar as a model. **J Sci Food Agric**, v. 94, n. 1, p. 2–8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6369>. Acesso em: 18 jan. 2025.

IHLE, V. *et al.* Tebuconazole-based fungicide impairs embryonic development of the South African Clawed Frog *Xenopus laevis*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 116, 104708, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104708>. Acesso em: 05 nov. 2025.

IUCN. 2024. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Versão 2024-2. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 12 jan. 2025.

JANUÁRIO, T. L. S. *et al.* Danos à saúde humana e ao meio ambiente ocasionados pelo uso de agrotóxicos na produção de produtos agrícolas no Brasil. **RICIA**, v. 12, n. 5, p. 462-477, 2021. DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2021.005.0037. Acesso em: 06 jan. 2025.

KATZ, L. C. *et al.* Structure and mechanisms of schooling intadpoles of the clawed frog, *Xenopus laevis*. **Anim Behav**, v. 29, n. 1, p. 20-33, 1981. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(81\)80148-0](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(81)80148-0). Acesso em: 02 nov. 2025.

KLOAS, W. *et al.* 2009. Does Atrazine influence larval development and sexual differentiation in *Xenopus laevis*? **Global Change Biol**, v. 107, n. 2, p. 376–384, 2009. DOI: 10.1093/toxsci/kfn232. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19008211/>. Acesso em: 23 jan. 2025.

KONCHINSKI, V. Brasil usa mais agrotóxicos que Estados Unidos e China juntos. **Brasil de Fato**, Curitiba, 05 fev. 2024. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2024/02/05/brasil-usa-mais-agrotoxicos-que-estados-unidos-e-china-juntos>. Acesso em: 08 jan. 2025

LAJMANOVICH, R. C. *et al.* B-esterases and Behavioral Biomarkers in Tadpoles Exposed to Pesticide Pyrethroid-TRISADA®. **Toxicol Environ Health Sci**, v. 10, p. 237-244, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13530-018-0371-3>. Acesso em: 05 nov. 2025.

LAJMANOVICH, R. C. *et al.* Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 587, p. 67–72, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.001>. Acesso em: 31 jan. 2025.

LANNOO, M. J. **Sapos malformados: o colapso dos ecossistemas aquáticos**. Edição online. Oakland, Califórnia: California Scholarship Online, 2012. 288 p. DOI: <https://doi.org/10.1525/california/9780520255883.001.0001>. Acesso em: 26 jan. 2025.

LI, D. *et al.* Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides, **Environ Poll**, Volume 208, Part B, p. 868-874, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.010>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LITTLE, E. E.; FINGER, S. E. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. **Environ Toxicol Chem**, v. 9, n. 1, p. 13-19, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>. Acesso em: 04 nov. 2025.

MELVIN, S. D.; WILSON, S. P. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2217-2223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.036>. Acesso em: 04 nov. 2025.

MENEZES J. F. F. *et al.* Contaminação de Águas Superficiais por Agrotóxicos: Análise dos Impactos Causados na Saúde Humana e Ambiental. **Persp Online: Biol & Saúde**, Campos dos Goytacazes, v. 11, n. 37, p. 19-35, 2021. DOI 10.25242/8868113720212259. Acesso em: 06 jan. 2025.

METEYER, C.U. Field guide to malformations of frogs and toads: with radiographic interpretations. **Biological Science Report**, US Geological Survey BSR 2000-0005, p. 20, 2000. Disponível em: <https://pubs.usgs.gov/bsr/2000/0005/bsr20000005.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2025.

MOREIRA, R. A. *et al.* Mortality, spatial avoidance and swimming behavior of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide Diuron. **Water, Air, Soil Poll**, v. 230, n. 125, 2019. DOI: 10.1007/s11270-019-4168-z. Acesso em: 26 jan. 2025.

NIKOLOFF, N. *et al.* Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 100, p. 275-281, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.021>. Acesso em: 12 jan. 2025.

PARKER, M.O. *et al.* The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 55, p. 94–100, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.011>. Acesso em: 03 fev. 2025.

PELTZER, P. M. *et al.* Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1165–1173, 2013. DOI: [10.1007/s10646-013-1103-8](https://doi.org/10.1007/s10646-013-1103-8). Acesso em: 11 jan. 2025.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M. *et al.* Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. **Environm Poll**, v. 244, p. 733-746, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>. Acesso em 27 jan. 2025.

PETERSON, E. K. *et al.* Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. **Curr Zool**, v. 63, n. 2, p. 185-194, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/cz/zox010>. Acesso em: 04 nov. 2025.

RAHMAN, M. M. *et al.* Structural mechanism of muscle nicotinic receptor desensitization and block by curare. **Nat Struct Mol Biol**, v. 29, p. 386–394, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00737-3>. Acesso em: 14 nov. 2025.

RODEL, M. O.; LINSENMAIR, K. E. Predator-induced Swarms in the Tadpoles of an African Savanna Frog, *Phrynomantis microps*. **Ethology**, v. 103, n. 11, p. 902-914, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1997.tb00132.x>. Acesso em: 02 nov. 2025.

SAMOJEDEN, C. G. *et al.* Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). **Sci Rep**, v. 12, 11926, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16039-z>. Acesso em: 29 out. 2025.

SCHIESARI, L.; CORRÊA, D. T. Consequences of agroindustrial sugarcane production to freshwater biodiversity. **GCB Bioenergy**, v. 8, p. 644-657, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcbb.12279>. Acesso em: 23 nov. 2025.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquat Toxicol**, v. 68, n. 4, p. 369-392, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>. Acesso em: 29 out. 2025.

SILVA, F. H. K. P. D. *et al.* Agrotóxicos no Brasil: uma compreensão do cenário atual de utilização e das propriedades do solo que atuam na dinâmica e retenção destas moléculas. **Res Soc Dev**, v. 119, 7911931614, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31614>. Acesso em: 06 jan. 2025.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 294–302, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/35067589>. Acesso em: 14 nov. 2025.

SPIELER, M.; LINSENMAIR, K. E. Aggregation Behaviour of *Bufo maculatus* Tadpoles as an Antipredator Mechanism. **Ethology**, v. 105, n. 8, p. 665-686, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.1999.00446.x>. Acesso em: 03 nov. 2025.

SPIELER, M. Risk of predation affects aggregation size: a study with tadpoles of *Phrynomantis microps* (Anura: Microhylidae). **Anim Behav**, v. 65, n. 1, p. 179-184, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.2030>. Acesso em: 02 nov. 2025.

WARSNESKI, A. *et al.* Fungicides from rice cultivation (tebuconazole and azoxystrobin) alters biochemical and histological markers of hammerhead tadpoles (*Boana faber*). **Environm Poll**, v. 341, 122900, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122900>. Acesso em: 19 jan. 2025.

WRUBLESWSKI, J. *et al.* Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 360–368, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1>. Acesso em: 22 jan. 2025.