



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

LUIZ FERNANDO DE BIAZI FREGOLENTE

**INFLUÊNCIA DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDA NO
COMPORTAMENTO DE GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana* SOB
DIFERENTES TEMPERATURAS**

Bauru, 2025

**INFLUÊNCIA DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDA NO
COMPORTAMENTO DE GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana* SOB
DIFERENTES TEMPERATURAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Bauru,
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliane Silberschmidt
Freitas

Bauru

2025

F859i

Fregolente, Luiz Fernando de Biazzi

INFLUÊNCIA DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDA NO
COMPORTAMENTO DE GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana* SOB
DIFERENTES TEMPERATURAS / Luiz Fernando de Biazzi Fregolente. --
Bauru, 2025

33 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientadora: Juliane Silberschmidt Freitas

1. agrotóxicos. 2. imidacloprida. 3. anfíbios. 4. comportamento
antipredatório. 5. ecotoxicologia. I. Título.

LUIZ FERNANDO DE BIAZI FREGOLENTE

**INFLUÊNCIA DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDA NO
COMPORTAMENTO DE GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana* SOB
DIFERENTES TEMPERATURAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Bauru,
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliane Silberschmidt
Freitas.

Bauru, 04 de Dezembro de 2025

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Juliane Silberschmidt Freitas - UNESP - Bauru/SP

Prof. Dr^ª. Daphine Ramiro Herrera - UNESP - Bauru/SP

Prof. Dr. Ricardo Utsunomia- UNESP - Bauru/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Eliana, mulher forte que, mesmo diante de todas as adversidades, manteve-se firme e presente. Me ajudando com coragem, sensibilidade e dedicação, sendo meu porto seguro ao longo de toda essa jornada, oferecendo acolhimento, conselhos e o exemplo mais sincero de resiliência que eu poderia ter.

Agradeço também à minha irmã, Caroline, que, mesmo passando por momentos difíceis, sempre encontrou um espaço para me ouvir, apoiar e caminhar ao meu lado.

Aos meus amigos, em especial Laura, Felipe e Paulo, agradeço pela empatia, parceria e por estarem presentes quando precisei, em momentos de ajuda, incentivo ou simplesmente acompanhar o processo com leveza.

À minha orientadora, Juliane, expresso meu sincero agradecimento pela disposição, sensibilidade e confiança. Sua capacidade de compreender meus desafios, acolher minhas limitações e orientar com firmeza e gentileza foi essencial para que este trabalho se concretizasse.

Estendo meu agradecimento ao Outback, empresa que me proporcionou sustentação financeira ao longo da graduação e que também contribuiu de forma significativa para minha formação pessoal e profissional. Ali aprendi sobre responsabilidade, esforço, trabalho em equipe e respeito. Em especial, agradeço aos meus gerentes Nicole e Honda, que não mediram esforços para me apoiar, inclusive fora do ambiente de trabalho. A compreensão e a confiança de vocês foram essenciais para que eu pudesse conciliar estudo, vida pessoal e trabalho.

RESUMO

O aumento da produção agrícola mundial, impulsionado pela modernização e uso intensivo de insumos químicos, levou a um aumento do consumo global de agrotóxicos, e o Brasil assumiu posição de liderança entre os maiores consumidores. O inseticida imidacloprida (IMD), pertencente à classe dos neonicotinóides, destaca-se por sua ampla utilização e elevada persistência ambiental, apresentando potencial de contaminação de corpos hídricos e causando efeitos adversos em organismos não-alvo. Os anfíbios são vertebrados ectotérmicos altamente sensíveis às variações ambientais e amplamente reconhecidos como bioindicadores devido à elevada permeabilidade cutânea e ao ciclo de vida bifásico. Considerando que os efeitos dos contaminantes podem ser modulados pela temperatura ambiental, especialmente sob gradientes térmicos mais elevados, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos subletais do inseticida IMD em girinos da espécie *Aquarana catesbeiana* submetidos à exposição crônica e concentrações ambientalmente relevantes, sob diferentes condições térmicas. A metodologia envolveu a exposição de girinos a duas concentrações do IMD (C1 = 190 e C2 = 300 $\mu\text{g/L}$) durante sete dias, sob temperaturas de 28 e 32°C, representativas de ambientes tropicais. Foram analisados parâmetros comportamentais relacionados à atividade locomotora e respostas anti-predatórias, como tempo de movimentação, tempo de congelamento e de alimentação, e frequência de aproximação ao predador. Os resultados mostraram que a temperatura exerceu efeito isolado sobre a atividade locomotora, com redução significativa do movimento a 32°C. Por outro lado, a exposição ao IMD a 28°C reduziu o tempo de congelamento nos girinos expostos à maior concentração (C2), o que sugere redução da resposta anti-predatória e da capacidade de imobilização frente a estímulos de ameaça. Não foram observadas diferenças significativas em outros parâmetros comportamentais, como tempo de alimentação e frequência de aproximação ao predador. Esses achados indicam que o IMD pode afetar seletivamente comportamentos mediados por mecanismos neurofisiológicos finos, relacionados à percepção de risco e resposta motora, corroborando a estudos que descrevem o potencial neurotóxico dos neonicotinóides. Conclui-se que o IMD, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes, é capaz de promover efeitos subletais e comportamentais em anfíbios, comprometendo respostas defensivas essenciais à sobrevivência. A temperatura, por sua vez, mostrou-se um fator modulador relevante, reforçando a importância de considerá-la em estudo sobre interações entre contaminantes químicos e variáveis ambientais na avaliação de riscos ecotoxicológicos. Tais resultados contribuem para a compreensão dos impactos do IMD sobre organismos aquáticos e destacam a necessidade de parâmetros normativos que representem adequadamente as condições térmicas tropicais brasileiras.

Palavras chave: agrotóxicos; imidacloprida; anfíbios; comportamento antipredatório; ecotoxicologia.

ABSTRACT

The increase in global agricultural production, driven by modernization and the intensive use of chemical inputs, has led to a rise in worldwide pesticide consumption, and Brazil has taken a leading position among the largest consumers. The insecticide imidacloprid (IMD), a member of the neonicotinoid class, stands out for its widespread use and high environmental persistence. However, there is growing concern about its potential to contaminate aquatic systems and its adverse effects on non-target organisms. Amphibians are ectothermic vertebrates that are highly sensitive to environmental variations and widely recognized as bioindicators due to their high skin permeability and biphasic life cycle. Considering that the effects of contaminants may be modulated by environmental temperature, especially under higher thermal gradients, this study aimed to evaluate the sublethal effects of the insecticide IMD on tadpoles of the species *Aquarana catesbeiana* subjected to chronic exposure at environmentally relevant concentrations under different thermal conditions. We exposed tadpoles to two IMD concentrations (C1 = 190 and C2 = 300 µg/L) for seven days at temperatures of 28°C and 32°C, representative of tropical environments. Behavioral parameters related to movement and antipredator responses, such as moving and freezing duration, feeding time, and predator approach, were analyzed. Results showed that temperature exerted an isolated effect on locomotor activity, with a significant reduction in movement at 32°C. Conversely, exposure to IMD at 28°C reduced freezing time in tadpoles exposed to the higher concentration (C2), suggesting a decrease in antipredator response and in the ability to immobilize when facing threat stimuli. No significant differences were observed in other behavioral parameters, such as feeding time and predator approach frequency. These findings indicate that IMD may selectively affect behaviors mediated by fine neurophysiological mechanisms related to risk perception and motor response, supporting previous studies that describe the neurotoxic potential of neonicotinoids. We observed that IMD can induce sublethal and behavioral effects in amphibians, even at environmentally relevant concentrations, compromising essential defensive responses for survival. Temperature, in turn, proved to be a relevant modulatory factor, reinforcing the importance of considering interactions between chemical contaminants and environmental variables in ecotoxicological risk assessments. These results contribute to a better understanding of IMD impacts on aquatic organisms and highlight the need for regulatory parameters that adequately represent tropical thermal conditions in Brazil.

Keywords: pesticides; imidacloprid; amphibians; antipredator behavior; ecotoxicology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. APRESENTAÇÃO GERAL DO PROBLEMA.....	1
1.2. AGROTÓXICOS, MUDANÇAS CLIMÁTICAS E ANFÍBIOS.....	3
1.3. TOXICIDADE E COMPORTAMENTO.....	6
2. OBJETIVO.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONTAMINANTE.....	7
3.2 ORGANISMOS.....	7
3.3. TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA EM LABORATÓRIO.....	8
3.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ANTIPREDATÓRIO.....	10
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

1.1. APRESENTAÇÃO GERAL DO PROBLEMA

Com o aumento da população mundial, houve uma pressão crescente sobre a produção de alimentos e, consequentemente, da produtividade do setor agrícola, o que impulsionou sua modernização e crescimento na utilização de insumos químicos (Carvalho, 2017). Hoje, cerca de 7,8 % das terras brasileiras são destinadas à agricultura (MAPA, Pereira *et al.*, 2012; Basso *et al.*, 2024) e esse avanço ocorre, em grande parte, devido às culturas destinadas às *commodities*, como milho, soja e cana-de-açúcar, que estão intrinsecamente associadas ao modelo produtivo intensivo adotado no país (Zalles *et al.*, 2018). Nesse contexto, o Brasil se destaca como um dos maiores consumidores globais de agrotóxicos, com um uso anual que supera 300 mil toneladas de produtos comerciais, o que corresponde a cerca de 130 mil toneladas de ingredientes ativos. Esse volume representa um aumento expressivo de 700% no consumo em relação ao ano de 2021, enquanto que, no mesmo período, a área agrícola do país aumentou apenas 78% (EMBRAPA, 2021).

Os agrotóxicos têm se configurado como agentes de crescente preocupação ambiental, devido ao seu elevado potencial de contaminação de ecossistemas naturais, já que apenas uma pequena parcela dos produtos aplicados nas plantações permanecem de fato nas áreas-alvo. Grande parte atinge ecossistemas aquáticos próximos, como rios, lagoas e lençóis freáticos, através da lixiviação ou escoamento superficial, dependendo ainda das propriedades físico-químicas de cada ingrediente ativo e das condições ambientais (Brovini *et al.*, 2023; Rebelo; Caldas, 2014). Os ambientes aquáticos são ambientes complexos que abrigam vários tipos de microhabitats, onde a dinamicidade depende intrinsecamente dos componentes bióticos e abióticos (Costa, 2008). Entretanto, a introdução de agentes químicos, como os agrotóxicos, pode afetar o funcionamento natural destas relações, interferindo em processos biológicos e ecológicos das espécies e até mesmo na estrutura de suas populações e comunidades (Costa, 2008; Rebelo e Caldas, 2014).

Atualmente no Brasil são registrados cerca de 399 ingredientes ativos utilizados na agricultura, sendo o imidacloprida (IMD) um inseticida de amplo uso (Friedrich *et al.*, 2021). Ele pertence à classe dos neonicotinóides e possui uma alta solubilidade e meia-vida em água, fator que favorece a contaminação dos recursos hídricos, onde pode persistir por até 30

dias (Borsuah *et al.*, 2020). No país, é um dos inseticidas mais encontrados em ambientes aquáticos nos últimos dez anos (Samojeden *et al.*, 2022; Friedrich *et al.*, 2021). Diante da persistência e do potencial de contaminação do IMD, é essencial o entendimento dos impactos ocasionados pela exposição a este contaminante em organismos mais sensíveis, como é o caso dos anfíbios.

Anfíbios são importantes indicadores da qualidade dos ecossistemas, visto que sua pele, onde realizam trocas gasosas, é altamente permeável e o ciclo de vida para a maioria das espécies é bifásico (Arjonas, 2025; Brühl *et al.*, 2011). Assim, muitas espécies estão sujeitas à contaminação por agrotóxicos durante suas diferentes fases de vida: em água durante a fase larval, e em terra, via pulverização ou alimentação de insetos contaminados. A contaminação por agrotóxicos é, de fato, já mencionada como um potencializador do declínio populacional dos anfíbios em diversas regiões do globo, sendo que muitas espécies utilizam áreas agrícolas para forrageamento e reprodução (Blaustein *et al.*, 2011; Ascoli-Morrete *et al.*, 2022; Anunciação *et al.*, 2024). De acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), os anfíbios fazem parte do segundo principal grupo animal mais ameaçado de extinção e ocupa o primeiro lugar dentre os vertebrados mais ameaçados, com 41% das espécies ameaçadas (IUCN, 2025).

A temperatura também é um fator fundamental influenciando os efeitos dos contaminantes em ecossistemas aquáticos e sua biota, principalmente para os organismos ectotérmicos, já que a temperatura ambiental atua como importante regulador de processos fisiológicos, comportamentais e morfológicos (Freitas *et al.*, 2017; Hooper *et al.*, 2013; Noyes *et al.*, 2009). Para os anfíbios, tal cenário se faz importante pois é comum a ocorrência da reprodução e desova de muitas espécies em lagoas temporárias de pequeno porte e baixo volume de água. Tais condições favorecem o superaquecimento da água, especialmente durante o verão, o qual apresenta médias de temperaturas mais elevadas em regiões tropicais. Adicionalmente, o verão chuvoso coincide com a época de reprodução de grande parte das espécies de anfíbios no Brasil (Freitas *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2017; Wilbur, 1990) e muitos corpos d'água, formados após períodos de chuvas prolongados, podem ser encontrados em regiões de cultivo, recebendo grande aporte de agrotóxicos (Giroto *et al.*, 2022; Schiesari e Corrêa, 2016).

1.2. AGROTÓXICOS, MUDANÇAS CLIMÁTICAS E ANFÍBIOS

A utilização de substâncias químicas na agricultura mundial se deu por volta da década de 1940, quando se iniciou a chamada “Revolução Verde”, período marcado pela modernização e crescimento da atividade agrícola. A partir de então, o processo tradicional de produção agrícola mudou para um foco de aumento da produtividade, envolvendo a aplicação em massa de componentes químicos, tais como agrotóxicos e fertilizantes (Peres *et al.*, 2003). No Brasil, o uso sistemático de agrotóxicos intensificou-se entre as décadas de 1960 e 1980 com a mecanização e implementação de políticas que estimulavam o consumo de insumos químicos, vinculado a um crédito de uso. A entrada e consolidação de indústrias químicas multinacionais no país e de políticas voltadas à expansão da fronteira agrícola favoreceram o mercado dos agrotóxicos. Ao mesmo tempo, o país enfrentou desafios de supervisão, registro e de fiscalização que impactam não apenas a saúde humana, mas também a saúde ambiental (Peres *et al.*, 2003; Lopes e Albuquerque., 2018)

Segundo dados da agência *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), no ano de 2021, o Brasil liderou o *ranking* mundial de uso de agrotóxicos, consumindo cerca de 60% a mais que o Estados Unidos, refletindo não apenas na quantidade absoluta de produtos aplicados, mas também no risco ambiental associado a moléculas persistentes desses insumos, como o IMD. O IMD se destaca por sua ampla aplicação em culturas como soja, milho e cana-de-açúcar. Ele pertence à classe dos neonicotinóides e atua sistemicamente no sistema nervoso central dos insetos, apresentando alta persistência no ambiente e baixa biodegradabilidade (Samojeden *et al.*, 2022). O elevado consumo, aliado às características físico-químicas deste ingrediente ativo, favorece a contaminação dos solos e corpos hídricos através dos processos de lixiviação e deriva, com impactos diretos e indiretos a organismos aquáticos e terrestres, além de contribuir para a perda de biodiversidade e desequilíbrios ecológicos (Mamy *et al.*, 2025; Fouad e Abdel-Raheem, 2025).

A classe dos neonicotinóides (NNIs) entrou no mercado nos anos 90 e substituiu o uso dos organofosforados e carbamatos no controle de pragas agrícolas, sendo desde então a classe mais utilizada de inseticida. O IMD, pertencente a este grupo, atua como agonista parcial nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), gerando alterações na permeabilidade iônica de sódio e potássio, além de bloquear a transmissão nervosa nas sinapses, causando falha motora, paralisia e morte em insetos. Apesar de apresentar seletividade para os invertebrados, os NNIs também podem afetar os vertebrados, induzindo

perturbações como tremores, hipotermia e alterações na função pupilar, o que indica que esse contaminante pode afetar organismos não-alvo (Nugnes *et al.*, 2023; Perez-iglesias *et al.*, 2014; Matsuda *et al.*, 2005). Em girinos, o IMD não necessariamente causa mortalidade aguda, entretanto, pode desencadear efeitos subletais ecologicamente e fisiologicamente relevantes (Samojeden *et al.*, 2021. Arcaute *et al.*, 2014)

A exposição do IMD em anfíbios pode estar associada à redução no tamanho corporal e no comprometimento de estruturas intestinais e orais, como discos orais e desgaste e desorganização das fileiras de denticulos. Concomitantemente, apresenta efeitos consistentes na atividade natatória, indicando impacto neurofisiológico, caracterizado por letargia, perda de resposta a estímulos e redução da velocidade de fuga (Velásquez e Bautista, 2025; Samojeden *et al.*, 2022). Estudos realizados na Europa identificaram resíduos de IMD em corpos hídricos próximos às áreas de cultivo, muitas vezes em concentrações acima dos valores de referência de qualidade da água estabelecidos pelos órgãos reguladores (Van Dijk *et al.*, 2013; Smit *et al.*, 2014). No Brasil, estudos confirmam que esse composto já é amplamente detectado em diferentes ecossistemas aquáticos, com concentrações registradas em até 3,65 µg/L em 28 corpos d'água do país, níveis suficientes para causar efeitos tóxicos em organismos não-alvo (Queiroz *et al.*, 2022). Essa contaminação pode comprometer a biodiversidade aquática, tais como espécies de anfíbios, tornando o IMD uma preocupação crescente na área da ecotoxicologia (Arcaute *et al.*, 2014). Como mencionado anteriormente, os anfíbios merecem destaque neste contexto, pois apresentam características que os tornam especialmente suscetíveis à contaminação ambiental.

Atualmente são conhecidos no mundo cerca de 8925 espécies de anfíbios, onde a maior diversidade se encontra na ordem Anura, com aproximadamente 7874 espécies (AmphibiaWeb, 2025). Muitas espécies de anfíbios sofrem declínios populacionais desde a década de 1950, entretanto, foi apenas em 1980 que a comunidade científica passou a reconhecer a gravidade e amplitude dos fatos (Toledo *et al.*, 2023), levando à criação da *Declining Amphibian Populations Task Force* (DAPTF) pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), cujo os principais objetivos foram entender os principais fatores que corroboram com o declínio da biodiversidade (Bishop *et al.*, 2012).

Recentemente, a segunda Avaliação Global de Anfíbios (*Global Amphibian Assessment 2 – GAA2*), concluída em 2022, mostrou que aproximadamente 41% das espécies conhecidas estão atualmente ameaçadas de extinção, representando uma piora em relação à

primeira avaliação de 2004 (*GAAI*) (Luedtke *et al.*, 2023). Esse estudo também destacou que as pressões sobre as populações de anfíbios incluem a intensificação de fatores já conhecidos, como perda de habitat, contaminação ambiental e introdução de espécies invasoras, bem como a emergência das mudanças climáticas e das doenças infecciosas. Ademais, esses animais podem depositar seus ovos em poças de água temporárias, onde outros vertebrados aquáticos usualmente não ocorrem, como é o caso de peixes. Esses ambientes são muitas vezes resultado do acúmulo de chuvas, e podem estar localizados próximos ou até mesmo inseridos em áreas agrícolas, onde os agrotóxicos estão ubiquamente presentes (Díaz-Paniagua *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2017).

Assim, a combinação entre as características biológicas dos anfíbios e de habitats susceptíveis à contaminação, coloca os anfíbios entre os vertebrados mais sensíveis às perturbações antrópicas dos ecossistemas. Um fator adicional é que a exposição a contaminantes químicos em habitats aquáticos temporários pode estar associada a outros estressores relevantes que têm o potencial de intensificar seus efeitos tóxicos (Blaustein *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2017), e o superaquecimento da água destaca-se neste contexto, especialmente em um cenário de rápidas mudanças climáticas.

O aquecimento do planeta exerce efeitos diretos nos padrões da vida animal, intensificando o risco de extinção para algumas espécies, visto que as alterações na temperatura podem afetar os processos fisiológicos, comportamentais e morfológicos das espécies (Walther *et al.*, 2002; Urban, 2015; Zhang *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2017). Para os ectotérmicos, os quais são diretamente dependentes da temperatura para termorregulação, o aumento gradual na temperatura média do planeta pode ter prejuízos em suas atividades de forrageamento e sucesso reprodutivo, especialmente se estiverem sujeitos a ambientes que ultrapassem seus limites de tolerância térmica (Pottier *et al.*, 2025; Oliver e Harrison., 2024; Jørgensen *et al.*, 2022; Kearney, 2013). O estresse térmico é apenas um fator ambiental encontrado em um ecossistema, onde diversas outras variáveis podem influenciar negativamente o desenvolvimento e sobrevivência dos anfíbios. Os agrotóxicos, quando combinados a altas temperaturas, típicas de climas tropicais, podem gerar efeitos tóxicos sinérgicos e prejudiciais à biota (Gordillo *et al.*, 2024; Quiroga *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2017). Ademais, a exposição a tais contaminantes podem comprometer processos fisiológicos essenciais, como o equilíbrio osmótico, a respiração cutânea e o metabolismo energético, reduzindo a capacidade de adaptação dos animais frente às variações ambientais. Estudos mostram que, sob altas temperaturas, a toxicidade de agrotóxicos tende a se intensificar,

potencializando a mortalidade e diminuindo o desempenho locomotor de girinos (Gordillo *et al.*, 2024; Freitas *et al.*, 2017).

1.3. TOXICIDADE E COMPORTAMENTO

Os anfíbios representam um grupo altamente diversificado, cujos diferentes estágios de desenvolvimento e ampla distribuição entre os ambientes aquáticos e terrestres conferem uma ampla plasticidade comportamental (Costa *et al.*, 2023; Fischer, 2023). Essa diversidade permite que estes animais expressem comportamentos variados em resposta às pressões ambientais e antrópicas (Hernández-Herrera *et al.*, 2024; Tahalová *et al.*, 2025). Os comportamentos possuem impactos significativos no desenvolvimento e no sucesso reprodutivo animal, uma vez que desempenham papéis essenciais em diferentes estágios do ciclo de vida. Por exemplo, durante a fase larval, os padrões de atividade, estratégias de forrageamento e respostas antipredação estão correlacionados ao crescimento, metamorfose e sobrevivência no ambiente (Maneti *et al.*, 2023; Landler, 2022)

Dentro desse contexto, os comportamentos antipredação assumem um papel importante, pois determinam como os anfíbios interagem com seu ambiente. Os comportamentos associados à presença do predador são particularmente sensíveis a fatores ambientais, podendo ser modulados por variações de temperatura, disponibilidade de refúgio ou até pela presença de contaminantes que afetam os mecanismos sensoriais e cognitivos envolvidos na detecção (Albuquerque *et al.*, 2025; Lucon-Xiccato, 2019; Sievers *et al.*, 2019). Agrotóxicos podem comprometer os mecanismos sensoriais responsáveis pela detecção de sinais químicos de predadores, já que muitos têm ação neurotóxica, afetando o sistema nervoso central e levando à diminuição da percepção do risco (Sievers *et al.*, 2019; Gordillo *et al.*, 2024). Além disso, estudos anteriores demonstram que o IMD pode acarretar no comprometimento da atividade locomotora, afetando de forma significativa a velocidade e a distância percorrida pelos girinos, além de apresentarem lentidão a estímulos externos e/ou falha de reação, com retardo neuromotor. Tais efeitos podem acarretar em consequências para a sobrevivência larval e, conseqüentemente, para a fase adulta (Sweeney *et al.*, 2021; Sievers *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2022)

A elevação da temperatura também influencia diretamente o metabolismo e o gasto energético dos ectotérmicos, podendo aumentar o tempo de atividade e diminuir respostas como a imobilidade, o que afeta a eficácia da defesa contra predadores (Albuquerque *et al.*, 2025; Baškiera e Gvoždík, 2021; Sillar e Robertson, 2009). Quando assimilados a outros

estressores ambientais, como a exposição a contaminantes, os comportamentos antipredação podem ser significativamente alterados (Katzenberger *et al.*, 2014; Sievers *et al.*, 2019). Estudos recentes demonstram ainda que a combinação desses fatores, contaminação química e estresse térmico, pode exercer efeitos aditivos sobre a forma larval dos anfíbios, afetando diversos fatores fisiológicos (Sinai *et al.*, 2024; Orford *et al.*, 2024). Assim, compreender como tais estressores, temperatura e agrotóxicos, implicam nos comportamentos antipredação, é essencial para avaliar os impactos das pressões ambientais sobre a sobrevivência e o sucesso ecológico dos anfíbios.

2. OBJETIVO

Este projeto teve como objetivo geral avaliar a toxicidade do inseticida IMD em girinos de *Aquarana catesbeiana*, considerando um cenário de exposição crônica a concentrações ambientalmente previstas (PEC) para aplicação em campos agrícolas brasileiros. Este estudo busca compreender, em um cenário representativo de região tropical, os potenciais impactos negativos gerados pela exposição a este inseticida em aspectos comportamentais de anfíbios, durante seus estágios larvais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONTAMINANTE

O ingrediente ativo utilizado neste estudo foi o imidacloprido em sua formulação comercial, Imidagold 700 WG (700 g/kg), o qual é comumente utilizado nos campos agrícolas.

3.2 ORGANISMOS

Para este experimento, foram utilizados girinos no estágio 25 de Gosner (Gosner, 1960) da espécie *Aquarana catesbeiana*, conhecida popularmente como rã-touro-americana. Essa espécie é amplamente empregada como modelo experimental em estudos de ecotoxicologia com anfíbios, tanto pela disponibilidade e facilidade de criação em cativeiro, quanto por já ter sua fisiologia amplamente conhecida. Além disso, os girinos apresentam um tamanho corporal maior em comparação às espécies neotropicais, permitindo a coleta de tecidos para análises, e respondem de maneira sensível às variações de temperatura e aos agrotóxicos em ensaios de toxicidade (Freitas *et al.*, 2016). Ademais, por ser reconhecida como uma espécie modelo para testes ecotoxicológicos, possibilita-se a posterior comparação

dos dados obtidos neste trabalho com outros estudos já realizados com a mesma espécie (Carvalho *et al.*, 2017; Motta *et al.*, 2023; Freitas *et al* 2016).

Os girinos foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP (Caunesp), localizado em Jaboticabal (SP). Após a chegada ao laboratório, os animais passaram por um período de aclimação de vinte dias em aquários, com parâmetros físico-químicos da água monitorados (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade), fotoperíodo controlado (12h claro/12h escuro) e alimentação padronizada. Esse período de adaptação é fundamental para reduzir o estresse dos organismos antes do início da fase de exposição experimental, assegurando maior confiabilidade nos resultados obtidos.

3.3. TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA EM LABORATÓRIO

Foram realizados testes de toxicidade crônica com exposições de 7 dias, para investigar os efeitos subletais do IMD em girinos. Os ensaios consideraram duas concentrações ambientalmente relevantes do contaminante (C1= 190 µg/L e C2= 300 µg/L). As concentrações foram definidas a partir do levantamento de registros feitos em campo da ocorrência do IMD em corpos hídricos e do cálculo das PEC, considerando dimensões de corpos d'água representativos para anfíbios tropicais. Foram avaliados, ao término dos experimentos, efeitos comportamentais, como serão descritos na próxima seção.

Recipientes contendo 600 ml de água, os quais representaram as réplicas deste experimento, foram regulados para temperaturas de 28 e 32°C. A manutenção das temperaturas nas réplicas foi regulada por termostatos com termômetros acoplados para regulação e adicionados em bacias de 20 L, onde os recipientes individuais foram aquecidos sincronicamente num mecanismo semelhante a um “banho maria”. Desta forma, as condições térmicas de cada recipiente individual imerso no tanque foram semelhantes para todos os grupos testados. As temperaturas tiveram seus valores registrados diariamente a fim de controlar as possíveis variações durante o período experimental. Os animais permaneceram sob constante aeração.

Foram utilizados três recipientes para cada tratamento (triplicatas), contendo 5 girinos cada (n=15 animais/tratamento). Previamente, os girinos tiveram seus estágios de desenvolvimento registrados de acordo com Gosner (1960). A fim de evitar choque térmico, o acréscimo de temperatura foi realizado gradualmente. Os girinos foram mantidos sob aeração constante durante todo o experimento e alimentados a cada dois dias com ração

comercial para peixes tropicais, de forma padrão e suficiente, evitando o acúmulo de resíduos nos compartimentos e com intuito de não comprometer os parâmetros físico-químicos da água. Os animais do grupo controle foram submetidos às mesmas condições experimentais que os demais, entretanto sem a presença do contaminante, para ambas as temperaturas experimentais. Ao término dos sete dias, os girinos tiveram seus comportamentos natatórios registrados e seguiram às análises, conforme descrito na seção seguinte.

Todos os animais foram sacrificados por imersão em solução letal de benzocaína (100 mg/L). Uma parcela dos girinos foi fixada em formol 10% para análises futuras. Todos os procedimentos que foram realizados com os girinos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, CEUA, da Faculdade de Ciências de Bauru (Certificação n. 596/2024).

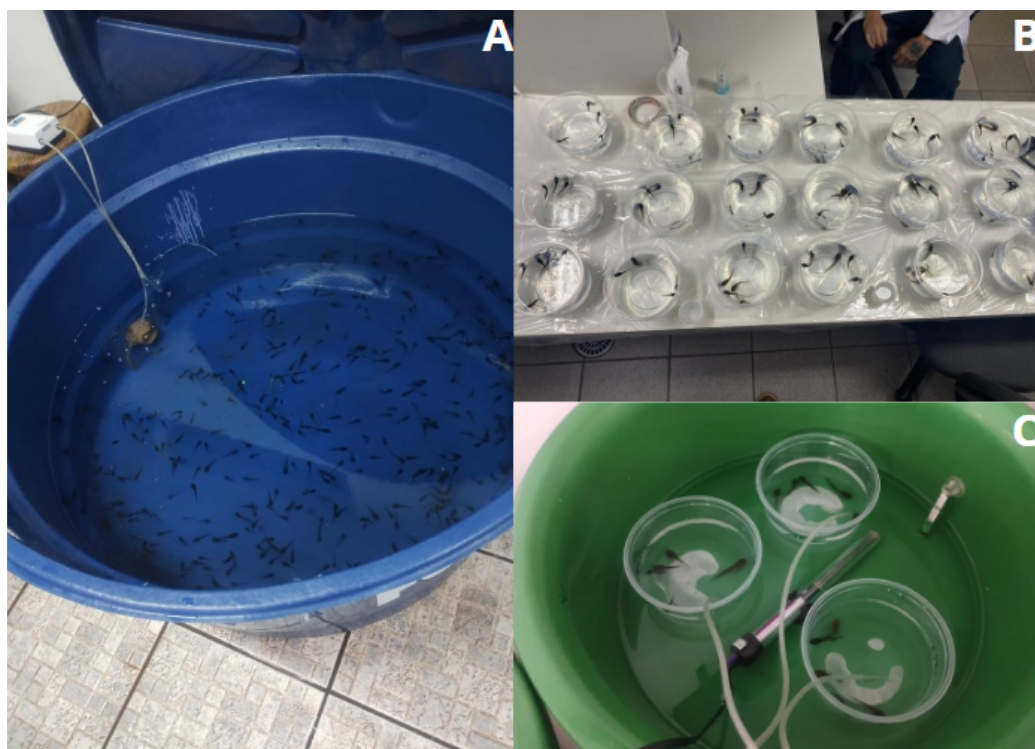


Figura 1.: (A) Seleção de girinos no estágio 25 de Gosner (1960); (B) Confeção de triplicatas e demarcação de cada grupo (Controle, C1 e C2), para cada temperatura analisada; (C) Figura representando a metodologia de “banho maria” para manter as temperaturas desejadas durante o experimento crônico.

3.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ANTIPREDATÓRIO

Foram registrados os comportamentos de nove girinos ($n = 9$) expostos a cada concentração de IMD com variações de temperatura, após período de exposição crônica. Após 60 segundos de aclimação, a atividade de natação de três girinos por réplica, foi registrada simultaneamente durante cinco minutos, utilizando uma câmera digital posicionada acima de um aquário de vidro retangular (22 x 45 cm). Assim, para cada grupo experimental, houveram três filmagens, contendo três girinos cada. A partir de cada filmagem foram retiradas 30 fotografias, a fim de registrar o quadrante ocupado por cada indivíduo, para cada tratamento, incluindo o controle. A água dos aquários experimentais foi aquecida para as temperaturas experimentais durante as gravações.

Os animais foram mantidos em aquários padronizados, sob condições controladas de luminosidade e temperatura, a fim de evitar interferências externas nos padrões comportamentais observados. Para o registro da distribuição dos indivíduos no aquário, foram confeccionados quadrantes equidistantes, com aproximadamente 9 cm entre si. A demarcação dos quadrantes foi realizada digitalmente no software *Photoshop*, onde foi previamente ajustado em escala real, garantindo precisão e reprodutibilidade nas análises (Figura 2).

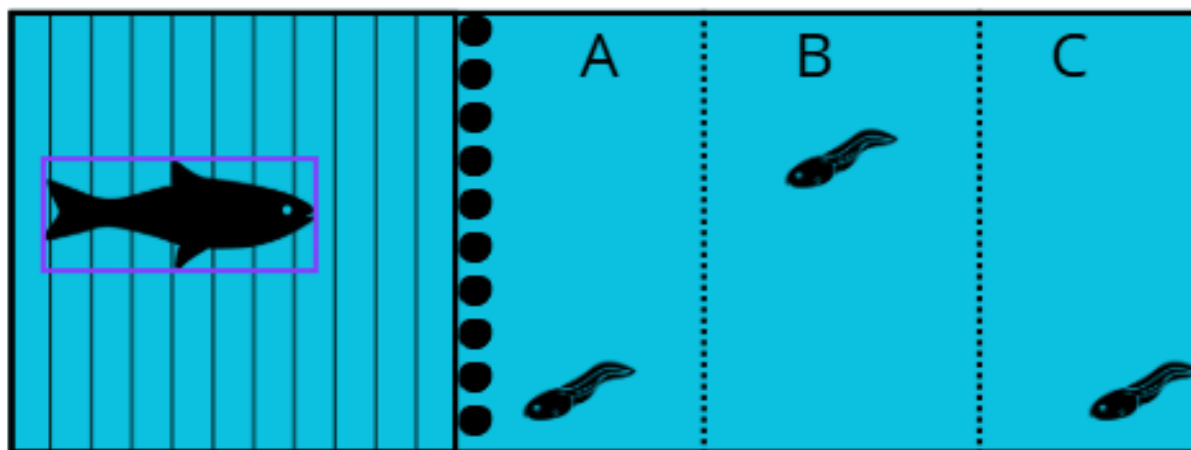


Figura 2.: Imagem mostrando o esquema para avaliação do comportamento de forrageamento dos girinos com percepção visual e química do predador onde (A) indica o quadrante mais próximo ao predador; (B) quadrante intermediário e (C) quadrante distante do predador.

Os indivíduos foram colocados na presença do predador, representado pela carpa comum (*Cyprinus carpio*), contido em uma gaiola, com o tamanho de aproximadamente 15

cm², cercada por malha fina (18 x 16mm) permitindo a visualização do predador e a detecção química do mesmo. Com o objetivo de avaliar a atividade de forrageamento dos girinos, foi oferecido alimento aos animais, constituído por ração de peixes tropicais triturada e modelada em forma de esfera. O alimento foi adicionado próximo à parede da gaiola do predador e posteriormente foi observado se os animais se arriscaram na alimentação, mesmo sob risco de predação (Figura 3).



Figura 3.: Registro do predador *Cyprinus carpio* durante o período de aclimação, acompanhado pela oferta de alimento para avaliação do comportamento de forrageamento dos girinos. À direita, observam-se os girinos de *Aquarana catesbeiana* em interação visual e química com o predador.

Através da metodologia adaptada por Freitas et. al (2019) para girinos (Figura 2 e 3), foi observado as seguintes variáveis: tempo de permanência no quadrante distante e no quadrante próximo ao predador, tempo de alimentação (s), tempo de congelamento (período em que o girino permaneceu imóvel), tempo de movimentação (s) e número de aproximações do predador. Os dados obtidos serviram de base para as análises estatísticas subsequentes, voltadas à identificação de alterações comportamentais relacionadas à exposição aos tratamentos avaliados.

3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a obtenção dos resultados, a normalidade e homogeneidade dos dados foi avaliada. Para dados paramétricos, foi empregada a análise de variância de dois fatores ANOVA Two-Way para examinar a interação entre os dois fatores independentes, temperatura e concentração do IMD, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Para dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para múltiplos fatores independentes. Todas as análises foram baseadas em Zar (1999), as quais foram realizadas no software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando $p \leq 0,05$ como critério de significância estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao tempo de movimentação dos girinos, observou-se uma redução na atividade locomotora dos indivíduos do grupo controle mantidos a 32° C em comparação com o controle a 28° C ($p = 0,015$), indicando um efeito isolado da temperatura sobre a mobilidade. Por outro lado, o contaminante não apresentou efeito significativo neste parâmetro em nenhuma das concentrações testadas (C1 e C2, tanto a 28° C quanto a 32° C) ($p > 0,05$). Além disso, não foi observado efeito combinado entre a temperatura e o contaminante sobre o tempo de movimentação dos animais.

Quanto ao tempo de congelamento, os resultados indicaram uma alteração significativa associada à exposição ao IMD em 28° C. Girinos expostos à maior concentração (C2) do contaminante apresentaram uma redução no tempo de congelamento quando mantidos a 28° C, em comparação ao grupo controle na mesma temperatura ($p = 0,0122$). Esse resultado evidencia um efeito de toxicidade comportamental do IMD, sugerindo que o inseticida pode interferir na resposta antipredatória, possivelmente reduzindo a capacidade dos girinos de permanecerem imóveis diante de estímulos de ameaça. Essa modulação comportamental pode estar relacionada a alterações neurofisiológicas induzidas pela ação do IMD sobre receptores nicotínicos de acetilcolina, conforme relatado em outros estudos com anuros da família Ranidae expostos ao IMD (Bouffard *et al.*, 2022).

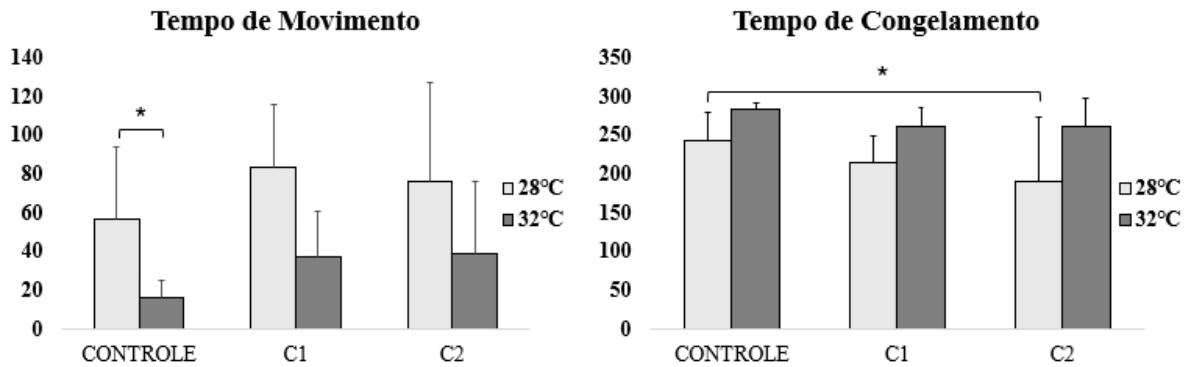


Figura 4.: Gráfico à esquerda: comportamento de movimentação sob temperaturas de 28 °C e 32 °C, com diferença significativa entre os controles ($p \leq 0,05$). À direita, o gráfico apresenta o comportamento de congelamento, evidenciando diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento C2 na mesma temperatura ($p \leq 0,05$).

Quando avaliados os demais parâmetros comportamentais, número de aproximações ao predador, tempo de permanência no quadrante mais distante, tempo de alimentação e tempo no quadrante próximo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, independentemente da temperatura ou da concentração do IMD ($p > 0,05$). Esses resultados indicam que, dentro das condições testadas, o contaminante não afetou de maneira expressiva os comportamentos exploratórios ou de forrageamento dos girinos de *A.catesbeiana*. A ausência de diferenças nesses parâmetros sugere que o IMD exerce um efeito mais específico sobre as respostas comportamentais associadas à defesa e à imobilidade (como o tempo de congelamento), do que sobre atividades de exploração ou alimentação.

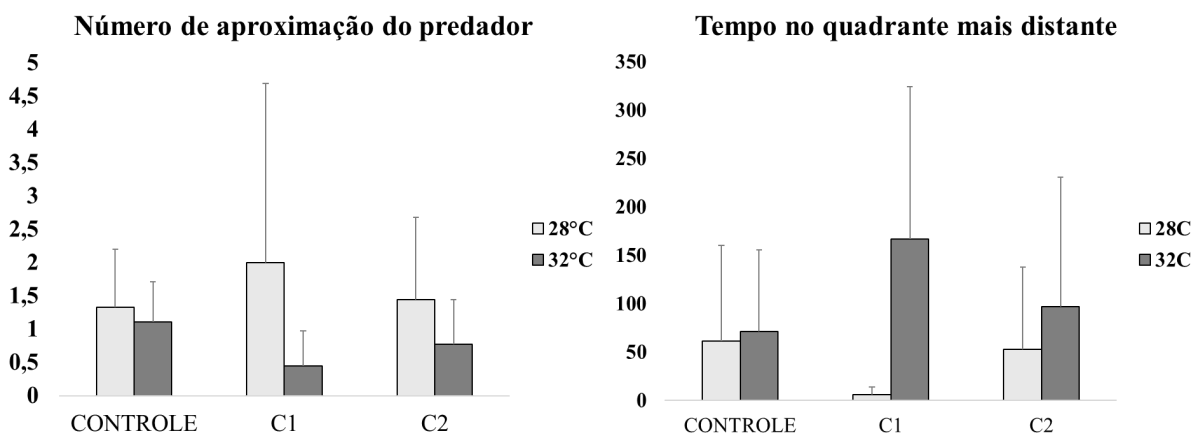


Figura 5: Gráfico à esquerda demonstra o número médio de aproximação dos girinos ao predador. Gráfico a direita demonstra o tempo em que o girino permaneceu no quadrante mais distante do predador, sem relevância estatística para os parâmetros analisados ($p > 0,05$).

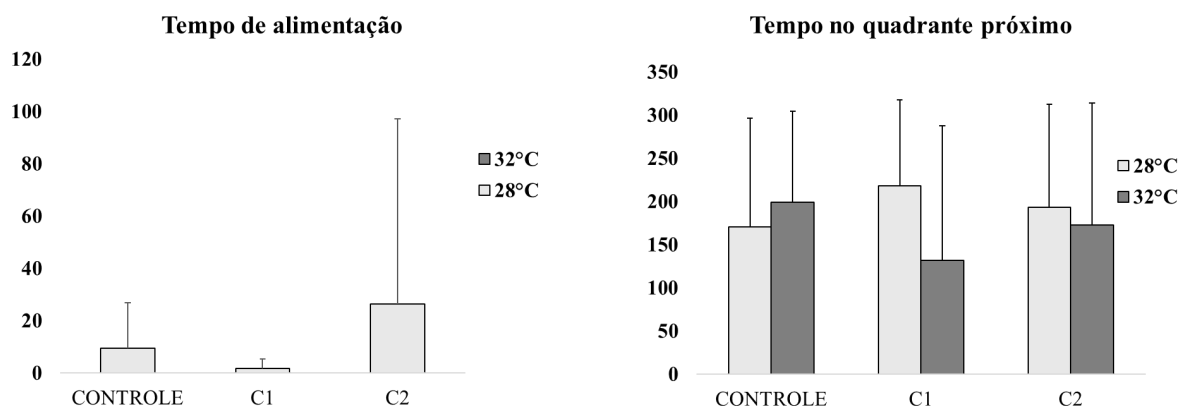


Figura 6: Gráfico à esquerda demonstra o tempo médio (s) de alimentação dos girinos. Gráfico a direita demonstra o tempo médio (s) em que o girino permaneceu no quadrante mais próximo do predador, sem relevância estatística para os parâmetros analisados ($p>0,05$).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a exposição crônica ao inseticida IMD, em concentrações ambientalmente relevantes, exerceu efeitos comportamentais específicos sobre os girinos de *A. catesbeiana*. A redução significativa no tempo de congelamento observada nos indivíduos expostos à maior concentração (C2) sugere que o contaminante pode interferir em respostas antipredação, o que corrobora com o papel neurotóxico amplamente descrito para os neonicotinóides, especialmente devido à sua ação agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Nugnes *et al.*, 2023; Perez-Iglesias *et al.*, 2014). Esse mecanismo pode resultar em hiperexcitação neuronal e, consequentemente, comprometer os comportamentos mediados por vias sensoriais e motoras, reduzindo a capacidade de resposta frente aos estímulos de ameaça, resultados semelhantes foram observados por Lee-Jenkins e Robinson. (2018), que avaliaram a resposta antipredação de *Lithobates sylvaticus* expostos ao IMD, onde demonstraram uma redução significativa na resposta ativa de fuga frente a estímulos.

A alteração do comportamento de congelamento, em contraste com a ausência de diferenças significativas nos parâmetros de movimentação, alimentação e exploração, indica que o IMD pode afetar seletivamente comportamentos dependentes de controle neural fino e percepção de risco. Essa sensibilidade comportamental já havia sido destacada por Sievers *et al.*, (2019) e Bouffard *et al.*, (2022) que observaram prejuízos na detecção de predadores em girinos expostos ao IMD. Assim, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o IMD,

mesmo em baixas concentrações, pode comprometer respostas antipredação críticas para a sobrevivência de anfíbios em ambientes naturais.

A influência isolada da temperatura observada na movimentação dos girinos, sem interação significativa com o contaminante, demonstra que este fator pode atuar como modulador fisiológico independente. A redução da atividade locomotora a 32° C em comparação a 28° C está em consonância com o que foi relatado por Freitas *et al* (2017), Putnam *et al* (1981) e Li *et al* (2025), que apontaram a temperatura como um determinante chave no desempenho metabólico dos anfíbios. Embora a maioria dos estudos reporte que aumentos de temperatura usualmente aceleram o metabolismo dos ectotérmicos, temperaturas elevadas podem também levar ao aumento do consumo energético e à diminuição da eficiência motora, refletindo em uma compensação entre manutenção fisiológica e atividade comportamental (Navas *et al.*, 2008; Angilletta, 2006). Isto pode ser especialmente verdadeiro para espécies adaptadas a climas temperados, como é o caso de *A. catesbeiana*, uma espécie norte-americana.

De fato, é apontado em literatura que a combinação entre estresse térmico e exposição a agrotóxicos tem potencial em gerar efeitos aditivos sobre o desenvolvimento e o comportamento de anfíbios (Gordillo *et al.*, 2024; Quiroga *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2017; Samojeden *et al.*, 2022). Ainda que o presente estudo não tenha evidenciado de forma clara, e sob diferentes níveis biológicos, interações significativas entre temperatura e o contaminante, o aumento das temperaturas em regiões tropicais pode amplificar os riscos ecotoxicológicos, conforme proposto por Zhang *et al* (2022) e Pottier *et al* (2025). Apesar disso, diversos artigos já disponíveis em literatura relataram efeitos combinados do estresse térmico e agrotóxicos em girinos, tais como alterações nas respostas antioxidantes e estresse oxidativo, alterações nas atividades das enzimas colinesterases, desregulação endócrina e comportamento (Zhang *et al.*, 2023; Freitas *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2022).

Os anfíbios podem ser considerados importantes bioindicadores sensíveis à contaminação ambiental (Costa, 2008; Freitas *et al.*, 2017). A exposição em habitats aquáticos temporários, frequentemente localizados próximos a áreas agrícolas, intensifica o risco de contato com agrotóxicos persistentes (Giroto *et al.*, 2022; Schiesari e Corrêa, 2016), como o IMD. Tais condições podem comprometer processos ecológicos essenciais, incluindo forrageamento e evasão de predadores, aumentando a vulnerabilidade das populações

(Albuquerque *et al.*, 2025; Hernández-Herrera *et al.*, 2024). Dessa forma, os resultados obtidos contribuem para a compreensão dos efeitos subletais e comportamentais do IMD em espécies de anfíbios, destacando a importância de considerar não apenas *endpoints* de letalidade, mas também alterações em parâmetros comportamentais como indicadores sensíveis de estresse ambiental (Katzenberger *et al.*, 2014; Manenti *et al.*, 2023). A redução do tempo de congelamento observada aqui pode representar uma perda funcional na resposta antipredação, o que, em ambientes naturais, pode resultar em aumento da predação e, consequentemente, redução da sobrevivência.

Em síntese, os resultados reforçam a necessidade de integrar abordagens ecotoxicológicas e comportamentais para compreender de forma abrangente os impactos de contaminantes emergentes sobre organismos aquáticos. Considerando a ampla utilização do IMD no Brasil (Samojeden, 2022; Friedrich *et al.*, 2021) e a persistência desse composto em corpos hídricos, é fundamental que estudos futuros explorem exposições de longo prazo e interações com variáveis ambientais múltiplas, visando melhor estimar os riscos ecológicos associados a esse neonicotinóide em regiões tropicais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a exposição crônica ao inseticida IMD, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes, é capaz de interferir seletivamente em comportamentos antipredação de girinos, reduzindo o tempo de congelamento e, consequentemente, a eficiência em respostas defensivas frente à presença de predadores. Essas informações reforçam o potencial neurotóxico do IMD e indicam que alterações comportamentais sutis podem representar importantes sinais de comprometimento fisiológico e ecológico em organismos aquáticos. Além disso, observou-se que a temperatura atuou como um fator modulador de efeito, pois nota-se um efeito do IMD temperatura-dependente sob o comportamento locomotor dos girinos. Apontamos aqui a importância em considerar a interação entre estressores ambientais como o aquecimento global e a contaminação química na avaliação dos riscos ecotoxicológicos em regiões tropicais. Esse ponto é especialmente relevante no contexto brasileiro, uma vez que a legislação nacional ainda não contempla parâmetros de temperatura representativos para a realidade climática do país, cuja predominância de condições tropicais pode intensificar a toxicidade de diversos contaminantes. Assim, a ausência de normativas que incorporem

faixas térmicas mais realistas pode subestimar os riscos ecotoxicológicos a organismos ectotérmicos, como os anfíbios.

Além dos pontos apresentados, os resultados contribuem para o entendimento dos efeitos subletais do IMD em anfíbios, auxiliando no entendimento de suas vias de ação para o grupo. Por fim, ressalta-se que este trabalho representa apenas uma parcela inicial de uma investigação mais ampla, a qual será futuramente complementada com análises morfológicas e bioquímicas, bem como testes de genotoxicidade, com o intuito de ampliar a compreensão sobre os efeitos fisiológicos desencadeados pelo IMD, associado às mudanças de temperatura em *A. catesbeiana*. Essas abordagens permitirão uma caracterização mais abrangente dos efeitos deste contaminante sobre a saúde dos anfíbios, contribuindo para o avanço das pesquisas em ecotoxicologia e para o aprimoramento das políticas ambientais voltadas à conservação de ambientes aquáticos.

6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A.. *et al.* Temperature and predator cues shape antipredator behavior in Amazonian tadpoles. **Ethology, Ecology & Evolution**, v. 37, n. 1, p. 107–116, 2025. DOI: 10.1080/03949370.2024.2444268.

AMPHIBIAWEB. AmphibiaWeb. Berkeley, CA: University of California, [s.d.]. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 12 out. 2025.

ANUNCIAÇÃO, P. R. *et al.* Amphibian conservation status in Brazil: spatial patterns, threats, and challenges. **Journal for Nature Conservation**, v. 79, art. 126611, 2024. DOI: 10.1016/j.jnc.2024.126611.

ANGILLETTA JR., M. J. Estimating and comparing thermal performance curves. **Journal of Thermal Biology**, v. 31, n. 7, p. 541–545, 2006. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2006.06.002.

ARCAUTE, C. R. *et al.* Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog (*Hypsiboas pulchellus*) tadpoles by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 632–639, 2014. DOI: 10.1016/j.ecolind.2014.05.034.

ARJONAS, V. H. *et al.* Review of biomonitoring metals in rivers using bullfrog tadpoles: an applicability study of animals exposed to Sorocaba River. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 37, e6, 2025. DOI: 10.1590/S2179-975X2424.

ASCOLI-MORRETE, T. *et al.* Bioaccumulation of pesticides and genotoxicity in anurans from southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 30, p. 45549-45559, 2022. DOI: 10.1007/s11356-022-19042-z.

BASSO, M. F.; NEVES, M. F.; GROSSI-DE-SA, M. F. Agriculture evolution, sustainability and trends, focusing on Brazilian agribusiness: a review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1296337, 2024. DOI: 10.3389/fsufs.2023.1296337.

BAŠKIERA, S.; GVOŽDÍK, L. Thermal dependence and individual variation in tonic immobility varies between sympatric amphibians. *Journal of Thermal Biology*, v. 97, p. 102896, 2021. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2021.102896.

BISHOP, P. J. *et al.* The amphibian extinction crisis: what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? **S.A.P.I.EN.S.**, v. 5, n. 2, p. 97–111, 2012.

BLAUSTEIN, A. R.; HATCH, A. C.; BELDEN, L. K.; SCHEESSELE, E. A. Global change: challenges facing amphibians. In: SEMLITSCH, R. D. (org.). *Amphibian Conservation*. Washington: Smithsonian Press, 2003.

BLAUSTEIN, A. R. *et al.* The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors. **The Year in Ecology and Conservation Biology**, v. 1223, p. 108–119, 2011.

BOUFFARD, J. *et al.* Effects of a neonicotinoid insecticide and population density on behavior and development of wood frogs (*Rana sylvatica*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2968–2980, 2022. DOI: 10.1002/etc.5477.

BORSUAH, J.F. *et al.* Literature review: Global neonicotinoid insecticide occurrence in aquatic environments. **Water**, v. 12, n. 12, p. 3388, 2020. DOI: 10.3390/w12123388.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lavouras são apenas 7,6% do Brasil, segundo a NASA. **Portal Agricultura Sustentável**, Brasília, 28 dez. 2017. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/dados-da-nasa-demonstram-que-apesar-7-6-da-area-do-brasil-e-ocupada-por-lavouras>.

BROVINI, E.M. *et al.* Occurrence and environmental risk assessment of 22 pesticides in Brazilian freshwaters. **Aquatic Toxicology**, v. 260, p. 106566, 2023. DOI: 10.1016/j.aquatox.2023.106566.

BRÜHL, C.A.; PIEPER, S.; WEBER, B. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 2465–2472, 2011.

CARVALHO, C. S. *et al.* Blood cell responses and metallothionein in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles exposed to contaminated water from a neotropical reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 29, p. e112, 2017. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.12.012

CARVALHO, F.P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017. DOI: 10.1002/fes3.108.

COSTA, A. *et al.*, Sebastiano. Recent advances in the behavioral ecology of European plethodontid salamanders. **Animals**, v. 13, n. 23, p. 3667, 2023. DOI: 10.3390/ani13233667.

COSTA, C.R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000700038.

DÍAZ-PANIAGUA, C. *et al.* Temporary ponds from Doñana National Park: a system of natural habitats for the preservation of aquatic flora and fauna. **Limnética**, v. 29, n. 1, p. 41–58, 2010.

EMBRAPA. Agrotóxicos no Brasil. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/qualidade/dinamica/agrotoxicos-no-brasil>

FISCHER, E.K. Form, function, foam: evolutionary ecology of anuran nests and nesting behaviour. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 378, n. 1884, art. 20220141, 2023. DOI: 10.1098/rstb.2022.0141.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Pesticides use and trade 1990–2021. Rome: FAO, 2023. 56 p. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org>. Acesso em: 12 out. 2025.

FOUAD, M. R.; ABDEL-RAHEEM, S. A. A. *An overview on the fate and behavior of imidacloprid in agricultural environments*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 61345–61355, 2024. DOI: 10.1007/s11356-024-35178-6.

FREITAS, J. S. *et al.* Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* and *Rhinella schneideri* tadpoles. **Chemosphere**, v. 185, p. 548–562, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.061.

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*). **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 23, p. 13095–13104, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.6b04076.

FREITAS, J. S. *et al.* Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109446, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109446

FRIEDRICH, K. *et al.* Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, e00061820, 2021. DOI: 10.1590/0102-311X00061820.

GIROTTI, L. *et al.* Using mesocosms to evaluate the impacts of pasture intensification and pasture-sugarcane conversion on tadpoles in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. online, p. 1–15, 2022. DOI: 10.1007/s11356-022-23691-5.

GORDILLO, L. *et al.* Changes in thermal sensitivity of *Rhinella arenarum* tadpoles exposed to sublethal concentrations of different pesticide fractions (Lorsban® 75WG). **Journal of Thermal Biology**, v. 120, 103816, 2024. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2024.103816.

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

HERNÁNDEZ-HERRERA, C. I.; PÉREZ-MENDOZA, H. A.; FORNONI, J. Geographic variation in developmental plasticity among populations of the canyon treefrog in response to temperature and pond-drying. **Journal of Zoology**, v. 324, n. 2, p. 103–117, 2024. DOI: 10.1111/jzo.13202.

HOOVER, M. J. *et al.* Interactions between chemical and climate stressors: a role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 32–48, 2013. DOI: 10.1002/etc.2043.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species: Version 2024. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 set. 2025.

JØRGENSEN, L. B. *et al.* Extreme escalation of heat failure rates in ectotherms with global warming. **Nature**, v. 611, n. 7934, p. 93–98, 2022. DOI: 10.1038/s41586-022-05334-4.

KATZENBERGER, M. *et al.* Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e98265, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098265.

KEARNEY, M. R.; BUCKLEY, L. B. Activity restriction and the mechanistic basis for extinctions under climate warming. **Ecology Letters**, v. 16, n. 12, p. 1470–1479, 2013. DOI: 10.1111/ele.12192.

LANDLER, L. Orientation and emigration of larval and juvenile amphibians: selected topics and hypotheses. **Amphibia-Reptilia**, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1163/15685381-bja10081.

LEE-JENKINS, S. S. Y.; ROBINSON, S. A. Effects of neonicotinoids on putative escape behavior of juvenile wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) chronically exposed as tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 12, p. 3115–3123, 2018.

LI, W. *et al.* High warming restricts the growth and movement of a larval Chinese critically endangered relict newt. **Biology**, v. 14, n. 8, p. 942, 2025. DOI: 10.3390/biology14080942.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018. DOI: 10.1590/0103-1104201811714.

LUCON-XICCATO, T. Tadpoles modulate antipredator responses according to vegetation abundance during the embryonic stage. **Journal of Zoology**, v. 308, n. 4, p. 259–265, 2019. DOI: 10.1111/jzo.12671.

LUEDTKE, J. 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. DOI: 10.1038/s41586-023-06578-4.

MANENTI, R. *et al.* Larval development and poor trophic resource availability: local adaptations and plasticity in a widespread amphibian species. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 36, n. 3, p. 529–541, 2023. DOI: 10.1111/jeb.14155.

MAMY, L. *et al.* Impacts of neonicotinoids on biodiversity: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 32, n. 6, p. 2794–2829, 2025. DOI: 10.1007/s11356-023-31032-3

MATSUDA, K. *et al.* Neonicotinoids show selective and diverse actions on nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology and receptor modeling. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1442–1452, 2005. DOI: 10.1271/bbb.69.1442.

MOTTA, A. G. C. *et al.* Assessment of multiple biomarkers in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to zinc oxide nanoparticles and zinc chloride. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 13755–13772, 2023. DOI: 10.1007/s11356-022-23018-4.

NAVAS, C. A.; GOMES, F. R.; CARVALHO, J. E. de. Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: integration and evolutionary implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A – Molecular & Integrative Physiology*, v. 151, n. 3, p. 344–362, 2008. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.07.003.

NOYES, P. D. *et al.* The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. **Environment International**, v. 35, n. 6, p. 971–986, 2009. DOI: 10.1016/j.envint.2009.02.006.

NUGNES, R. *et al.* Imidacloprid: comparative toxicity, DNA damage, ROS production and risk assessment for aquatic non-target organisms. **Environmental Pollution**, v. 316, pt. 2, p. 120682, 2023. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120682.

OLIVER, K.E.; HARRISON, X. A. Temperature and land use change are associated with *Rana temporaria* reproductive success and phenology. **PeerJ**, v. 12, e17901, 2024. DOI: 10.7717/peerj.17901.

ORFORD, J. T. *et al.* Impacts of exposure to ultraviolet radiation and an agricultural pollutant on morphology and behavior of tadpoles (*Limnodynastes tasmaniensis*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1615–1626, 2024. DOI: 10.1002/etc.5895.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Orgs.) *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 21–41

PEREIRA, P. A. A. *et al.* The development of Brazilian agriculture: future technological challenges and opportunities. **Agriculture & Food Security**, v. 1, art. 4, 2012. DOI: 10.1186/2048-7010-1-4.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. *et al.* The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide Glacoxan Imida on *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 120–126, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.002.

POTTIER, P. *et al.* Vulnerability of amphibians to global warming. **Nature**, v. 639, n. 8056, p. 954–961, 2025. DOI: 10.1038/s41586-025-08665-0.

PUTNAM, Robert W.; BENNETT, Albert F. Thermal dependence of behavioural performance of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 29, n. 2, p. 502–509, 1981. DOI: 10.1016/S0003-3472(81)80111-X.

QUEIROZ, L. G. *et al.* Ecological risk of imidacloprid on the Brazilian non-target freshwater organisms *Chironomus sancticarloi* and *Poecilia reticulata*. **Environmental Monitoring and Assessment**, E v. 194, n. 751, 2022. DOI: 10.1007/s10661-022-10418-9

QUIROGA, L. B. *et al.* Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of *Rhinella arenarum* tadpoles. **Chemosphere**, v. 219, p. 671–677, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.059.

REBELO, R. M; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199–1208, 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140165.

SAMOJEDEN, C. G. *et al.* Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri*. **Scientific Reports**, v. 12, art. 11926, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-16039-z.

SCHIESARI, L.; CORRÊA, D. Consequences of agroindustrial sugarcane production to freshwater biodiversity. **GCB Bioenergy**, v. 8, p. 644–657, 2016.

SIEVERS, M. *et al.* Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: a meta-analysis. **Science of the Total Environment**, v. 693, p. 133570, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.376.

SIEVERS, M. *et al.* Contaminant mixtures impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 482–488, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.028.

SILLAR, K. T.; ROBERTSON, R. M. Thermal activation of escape swimming in *Xenopus laevis* larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 3619–3629, 2009. DOI: 10.1242/jeb.029892

SINAI, N. *et al.* Living in a multi-stressor world: nitrate pollution and thermal stress interact to affect amphibian larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 227, n. 23, 2024. DOI: 10.1242/jeb.247629.

SMIT, C. E.; POSTHUMA-DOODEMAN, C. J. A. M.; VAN VLAARDINGEN, P. L. A.; DE JONG, F. M. W. Ecotoxicity of imidacloprid to aquatic organisms: derivation of water quality standards. Bilthoven: **RIVM**, 2014. 92 p.

SWEENEY, M. R.; THOMPSON, C. M.; POPESCU, V. D. Sublethal, behavioral, and developmental effects of imidacloprid on larval *Rana sylvatica*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1840–1849, 2021. DOI: 10.1002/etc.5047.

TAHALOVÁ, Kamila; ŠUGERKOVÁ, Monika; GVOŽDÍK, Lumír. Varying thermal dependence of life history traits predicts responses to environmental change in amphibian larvae. **Freshwater Biology**, v. 70, p. 2385–2399, 2025. DOI: 10.1111/fwb.70007.

THOMPSON, C. M.; SWEENEY, M. R.; POPESCU, V. D. Carryover effects of pesticide exposure and pond drying on performance and behavior in a pool-breeding amphibian. **Journal of Zoology**, v. 317, n. 4, p. 229–240, 2022. DOI: 10.1111/jzo.12975.

TOLEDO, L. F. *et al* retrospective overview of amphibian declines in Brazil's Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 277, p. 109845, 2023. DOI: 10.1016/j.biocon.2022.109845.

VELÁSQUEZ, T. M.; BAUTISTA, M. H. Acute toxicity of imidacloprid and 2,4-D in two tropical anurans. **Ecotoxicology**, v. 34, p. 392–400, 2025. DOI: 10.1007/s10646-024-02843-y.

URBAN, M. C. Accelerating extinction risk from climate change. **Science**, v. 348, n. 6234, p. 571–573, 2015. DOI: 10.1126/science.aaa4984.

VAN DIJK, T. C.; VAN STAALDUINEN, M. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e62374, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0062374.

WALTHER, G.-R. *et al*. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, p. 389–395, 2002. DOI: 10.1038/416389a.

WILBUR, H. M. Coping with chaos: toads in ephemeral ponds. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 5, n. 2, p. 37–39, 1990. DOI: 10.1016/0169-5347(90)90043-D

ZALLES, V; HANSEN, M. C.; POTAPOV, P. V.; *et al*. Near doubling of Brazil's intensive row crop area since 2000. **PNAS**, v. 116, n. 2, p. 428–435, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1810301115.

ZHANG, L. *et al*. Ecophysiological vulnerabilities to global warming. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fevo.2022.946836.

ZHANG, W. *et al*. Study effect and mechanism of levofloxacin on the neurotoxicity of *Rana nigromaculata* tadpoles exposed to imidacloprid based on the microbe-gut-brain axis.

Science of the Total Environment, v. 872, p. 162098, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162098

ZHU, X. *et al.* Predators constrain larval development in the endangered Chinghai spiny newt. **Ecology and Evolution**, v. 14, n. 5, e11396, 2024. DOI: 10.1002/ece3.11396.