



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

NATALLIA VÍVIAN NASCIMENTO DA SILVA MAIA

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO FENANTRENO NO
DESENVOLVIMENTO LARVAL E METAMORFOSE DA PERERECA**
Dendropsophus branneri (ANURA, HYLIDAE)

RECIFE

2024

Natallia Vívian Nascimento da Silva Maia

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO FENANTRENO NO
DESENVOLVIMENTO LARVAL E METAMORFOSE DA PERERECA**
Dendropsophus branneri (ANURA, HYLIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Animal

Orientador: Dr. Pedro Ivo Simões

Coorientador: Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

RECIFE

2024

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Maia, Vívian Nascimento da Silva

Efeitos letais e subletais do Fenantreno sobre o desenvolvimento larval metamorfose da perereca
Dendropsophus branneri (Anura, Hylidae). / Vívian Nascimento da Silva Maia. – 2024.

63 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Pedro Ivo Simões.

Coorientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências.

1. Anfíbios. 2. Biomarcadores. 3. Ecotoxicologia 4. HPAs. 5. Poluição aquática. 6. I. Simões, Pedro Ivo (Orient.). II. Carvalho, Sérgio Martins de Carvalho (Coorient.). III. Título.

590

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-192

NATALLIA VÍVIAN NASCIMENTO DA SILVA MAIA

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DO FENANTRENO NO
DESENVOLVIMENTO LARVAL E METAMORFOSE DA PERERECA**
Dendropsophus branneri (ANURA, HYLIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Biologia Animal

Aprovado em: 26/07/2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a. Raquel Fernanda Salla Jacob (Examinadora externa)
Universidade de Houston

Prof.^o. Dr. João Lucas Leão Feitosa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^o. Dr.^a. Tamí Mott (Examinador Externo)
Universidade Federal de Alagoas

Prof^o. Dr^a. Lília Pereira de Souza Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Pedro Murillo Sales Nunes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

À minha mainha, por não desistir da vida e lutar
por nós.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu Senhor Jesus, com quem entendi nessa jornada que melhor é o final das coisas do que o seu começo. E, com quem aprendo que existe um tempo certo para todo propósito debaixo do céu.

Agradeço a minha mãe, minha mainha, pela resistência, por ter investido em meus estudos e feito além do que podia para que hoje eu tivesse oportunidades que um dia ela nunca teve. Obrigada por incentivar os meus sonhos, as suas batalhas sempre foram um incentivo para mim. Agradeço ao meu esposo, Leonardo, por ser tão parceiro, por acreditar em mim mais do que qualquer pessoa, inclusive eu mesma. Sou grata por me fazer aprender a respirar nessa etapa tão importante para mim.

Aos meus orientadores, Pedro Ivo, que me aceitou desde a iniciação científica, que ensina sobre o mundo dos sapinhos como ninguém mais faz! Obrigada pela paciência, por sempre tirar minhas dúvidas, e por realizar uma orientação com tanta maestria. Ao Paulo Carvalho, que me acolheu tão bem no laboratório. Obrigada por tantas vezes ter parado tudo para me ensinar e sempre se certificar que de fato eu estava aprendendo. Me sinto honrada em ter um orientador tão humano e de excelência.

Aos meus colegas do Laboratório de Herpetologia, agradeço pelos bons anos desde a graduação em parceria e trabalho. Agradeço ao Edson pela paciência e disponibilidade a me ensinar o R e muito da parte estatística. Agradeço a Anninha, ao Henrique por me ouvirem tanto, pelas palavras bondosas e risadas nesses dois anos. Agradeço a Bel e Paola que nesses últimos momentos foi essencial a amizade compartilhada.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, um lugar em que passei dias chorando para tentar aprender a bioquímica. Mas sempre salva por Maria pela sua sabedoria e paciência, obrigada por me ajudar tantas vezes de uma forma tão única. Ao Célio, por ter apontado os erros e mostrar o melhor caminho, a Shay e Letícia pelo apoio a todo momento.

Cercada de bons amigos, agradeço aos que mantive nesses dois anos permitindo boas risadas, calma e torcendo sempre por mim como Ana Célia, Zulayne, Thaís e Maysa. Assim como Sara, Bruna, Ritinha, Coutinho, Pedro e Mike. Amigas como Héllen, Fernanda, Liliane que

sempre acreditaram em mim, obrigada. Também agradeço ao Isaque, que me aceitou na família, sempre me ajudando nas ideias e ilustrações.

Agradeço a banca por todas as contribuições. Foram essenciais para finalização dessa etapa, agradeço por cada um que se disponibilizou e incentivou a nossa publicação.

À Universidade Federal de Pernambuco, agradeço muito a CAPES pela concessão da bolsa e ao PPGBA pelos aprendizados.

“Só se preserva aquilo que se ama, só se ama aquilo que se conhece.”

Autor Desconhecido.

RESUMO

Os anfíbios são especialmente sensíveis a poluição no ambiente do que outros tetrápodes devido à sua pele altamente permeável e a seu desenvolvimento larval que ocorre em água doce. Sabe-se que os ambientes aquáticos são sujeitos ao descarte de diversos resíduos produzidos por atividades antrópicas. Uma classe de resíduos poluentes frequentemente encontrados em ecossistemas de água doce são os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), e entre os HPAs, o fenantreno é considerado prioritário para estudos ecotoxicológicos pela sua onipresença nos ambientes e potencial elevado de toxicidade. Neste estudo, foram investigados os efeitos letais e subletais da exposição ao fenantreno sobre o desenvolvimento larval de *Dendropsophus branneri*, uma perereca neotropical potencialmente suscetível a presença de derivados de petróleo. Para isto, foram avaliados os efeitos da exposição na taxa de mortalidade, no desenvolvimento dos girinos a partir do estágio de desenvolvimento 25 de Gosner, utilizando múltiplos biomarcadores nos parâmetros morfológicos de peso e comprimento totais, biomarcadores enzimáticos glutationa-S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE) e catalase (CAT), velocidade natatória e trajetória de natação. Os girinos foram expostos a concentrações de 10,8, 18,6, 76,2, 187,7 e 279,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ em dois experimentos com exposição de 15 e 60 dias. A concentração de fenantreno dissolvido letal a 50% dos girinos de *D. branneri* após exposição de 15 dias ($\text{CL}_{50-15\text{dias}}$) foi igual a $154,8 \pm 42 \mu\text{g L}^{-1}$ (estimativa \pm erro padrão). As concentrações de efeito observado (CEO) após 15 dias de exposição para atrasos no desenvolvimento larval, diminuição do peso úmido final, diminuição do comprimento, indução das enzimas GST, AChE e CAT, foram iguais a 76,2, 10,8, 279,6, 76,2, 76,2 e 76,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Não foi verificada alteração na velocidade natatória dos girinos expostos ao fenantreno ao longo de 12 dias, e os mapas de trajetória sugerem uma perda do comportamento de tigmotaxia. No experimento com exposição de 60 dias, a média do estágio Gosner dos controles atingiu 42,1, em contraste com médias iguais a 32,0, 30,0, 28,9 e 28,4 para girinos expostos a 10,8, 18,6, 76,2 e 187,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, caracterizando um progressivo aumento concentração dependente do atraso. O estágio 42 atingido na maioria dos controles após 60 dias se caracteriza pela formação das patas anteriores, estando as posteriores já formadas e com dedos. O atraso verificado nos girinos expostos ao fenantreno por 60 dias, com médias Gosner entre 28 e 32, indica que larvas permaneceram na etapa inicial de desenvolvimento das patas traseiras, inclusive na menor concentração de 10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, mais próxima de concentrações ambientalmente relevantes. Este estudo é inédito por fornecer dados ecotoxicológicos detalhados sobre os efeitos do fenantreno em girinos de uma espécie

neotropical, *Dendropsophus branneri*. Os resultados então destacam a alta sensibilidade, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes, contribuindo significativamente para a compreensão dos riscos que os HPAs representam para os anfíbios neotropicais e ressaltando a necessidade de estratégias de conservação.

Palavras-chave: Anfíbios; Biomarcadores; Ecotoxicologia; HPAs; Poluição aquática.

ABSTRACT

Amphibians are particularly sensitive to environmental pollution due to their highly permeable skin and aquatic larval development. It is known that aquatic environments are subject to the disposal of various wastes produced by anthropogenic activities. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are common class of pollutants found in freshwater ecosystems, and among PAHs, phenanthrene is considered a priority for ecotoxicological studies due to its ubiquitous presence and high toxicity potential. This study investigated the lethal and sublethal effects of phenanthrene exposure on the larval development of *Dendropsophus branneri*, a neotropical treefrog potentially susceptible to petroleum derivatives. The effects of exposure on mortality rate, development from Gosner stage 25, morphological parameters total weight and length, enzymatic biomarkers glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and catalase (CAT), swimming speed and swimming trajectory were evaluated. Tadpoles were exposed to concentrations of 10.8, 18.6, 76.2, 187.7 and 279.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ phenanthrene L-1 in two experiments with 15- and 60-days exposures. The concentration of dissolved phenanthrene lethal to 50% of *D. branneri* tadpoles after 15 days of exposure (LC50-15days) was equal to $154.8 \pm 42 \mu\text{g L}^{-1}$ (estimate \pm standard error). The observed effect concentrations (OECs) after 15 days of exposure for delays in larval development, decreased final wet weight, decreased length, induction of GST, AChE and CAT enzymes were 76.2, 10.8, 279.6, 76.2, 76.2 and $76.2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. No alteration in swimming speed was observed in tadpoles exposed to phenanthrene over 12 days, and the trajectory maps suggest a loss of thigmotaxis behavior. In the experiment with 60-day exposure, the mean Gosner stage of the controls reached 42.1, in contrast to means of 32.0, 30.0, 28.9 and 28.4 for tadpoles exposed to 10.8, 18.6, 76.2 and $187.7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, characterizing a progressive concentration-dependent delay. Gosner stage 42, reached by most controls after 60 days, is characterized by the formation of the forelimbs, with the hindlimbs already formed and with digits. The delay observed in tadpoles exposed to phenanthrene for 60 days, with mean Gosner stages between 28 and 32, indicates that larvae remained in the initial stage of the hindlimb development, even at the lowest concentration of $10.8 \mu\text{g L}^{-1}$, closer to environmentally relevant concentrations. This study is novel in providing detailed ecotoxicological data on the effects of phenanthrene on tadpoles of a neotropical species, *Dendropsophus branneri*. The results highlight the high sensitivity, even at environmentally relevant concentrations, contributing to the the understanding of the risks that PAHs pose to neotropical amphibians and emphasizing the need for conservation strategies.

Keywords: Amphibians; Biomarkers; Ecotoxicology; PAHs; Aquatic pollution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Níveis hierárquicos quanto as respostas ecotoxicológicas medidas em diferentes níveis de organização biológica (Peltzer et al., 2024) 16
- Figura 2 - *Dendropsophus branneri* em vida. Esquerda: Vista lateral de um girino no estágio de desenvolvimento 37 de Gosner. Centro: Vista dorsolateral de um imago. Direita: Vista dorsolateral de uma fêmea adulta. Fotos: Natallia Vívian e Pedro Ivo Simões..... 19
- Figura 3- Taxas de mortalidade para girinos do anuro *Dendropsophus branneri* expostos a diferentes concentrações de fenantreno dissolvido na água por 1, 5, 10 e 15 dias, e representação gráfica do ajuste dos dados ao modelo logístico após 15 dias. Não foi verificada diferença nas taxas de mortalidade dos grupos controle e controle-solvente, que não está representado..... 33
- Figura 4 - Médias e erro padrão dos estágios de desenvolvimento de girinos da perereca *Dendropsophus branneri* expostas ao fenantreno dissolvido na água por períodos entre 1 a 15 dias. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as médias dos estágios Gosner comparados com a média do controle no dia respectivo, após ANOVA 2-way seguida do teste de Dunnet, ($p < 0,05$)..... 34
- Figura 5 - Médias dos estágios de desenvolvimento de girinos da perereca *Dendropsophus branneri* expostas ao fenantreno dissolvido na água por períodos entre 10 a 60 dias. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as médias dos estágios Gosner comparados com a média do controle no dia respectivo, após ANOVA 2-way seguida do teste de Dunnet, ($p < 0,05$) 35

Figura 6 - Peso úmido e comprimento total de girinos de *Dendropsophus branneri* expostos a diferentes concentrações de fenantreno por 15 dias. Asteriscos indicam grupos experimentais com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (C). CS: controle de solvente.

..... 36

Figura 7 - Atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST), Acetilcolinesterase (AChE) e Catalase (CAT) em girinos de *Dendropsophus branneri* expostos ao fenantreno por 15 dias. (A) GST; (B) AChE (C) CAT. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (C). CS: controle de solvente..... 37

Figura 8 - Velocidade média de natação espontânea de girinos da perereca *Dendropsophus branneri* expostas ao fenantreno dissolvido na água por 12 dias 38

Figura 9 - Mapas de trajetória dos girinos expostos ao fenantreno dissolvido na água por 12 dias em *Dendropsophus branneri* C: Controle; CS: controle de solvente

..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g L}^{-1}$	Micrograma por litro
AChE	Acetilcolinesterase
BSA	“bovine serum albumin” ou Albumina de soro Bovino
CAT	Catalase
CEO	Concentração de efeito observado
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CL ₅₀	Concentração Letal a 50% dos organismos expostos
DMSO	Dimetil sulfóxido
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GAA	Global Amphibian Assessment
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-transferase
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	International Union for Conservation of Nature
POP	Persistent Organic Pollutants
TNB	Tiolato
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WWF	World Wildlife Fund

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 ECOTOXICOLOGIA.....	22
2.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS, FENANTRENO E SEUS EFEITOS SOBRE VERTEBRADOS AQUÁTICOS	23
2.3 ANFÍBIOS COMO ESPÉCIES MODELO EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS	24
2.4 ESPÉCIE DO ESTUDO.....	25
2.5 BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....	26
2.5.1 BIOMARCADOR MORFOLÓGICO.....	26
2.5.2 BIOMARCADOR ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE - Glutathione S- transferase (GST)	27
2.5.3 BIOMARCADOR ENZIMÁTICO DE NEUROTOXICIDADE – ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	27
2.5.4 BIOMARCADOR DE DEFESA ANTIOXIDANTE - CATALASE (CAT) 28	
2.6 BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS.....	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. CAPÍTULO ÚNICO.....	30
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.2.1 Obtenção e manutenção de ovos fertilizados	34
4.2.2 Preparo das soluções de fenantreno e desenho experimental das exposições	35

4.2.5	MASSA E COMPRIMENTO	36
4.2.3	DESENVOLVIMENTO LARVAL	36
4.2.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	37
4.2.7	GLUTATIONA-S-TRANSFERASE	37
4.2.8	ACETILCOLINESTERASE.....	37
4.2.9	CATALASE	37
4.2.4	VELOCIDADE NATATÓRIA E TRAJETÓRIA DE NATAÇÃO.....	38
4.2.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
5.	RESULTADOS	39
5.1	TAXAS DE LETALIDADE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO FENANTRENO E CL ₅₀	39
5.2	ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DOS GIRINOS EXPOSTOS AOS FENANTRENO.....	40
5.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM PESO E EM COMPRIMENTO	44
5.6	COMPORTAMENTO NATATÓRIO	45
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÕES.....	52
	AGRADECIMENTOS	53
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Ecossistemas aquáticos são extremamente diversos e indispensáveis para manutenção da vida no planeta e estão entre os mais ameaçados do mundo (Linke, 2022). Ecossistemas de água doce são recursos naturais de grande importância econômica, além de possuírem valor cultural, social, biológico e educacional, oferecendo vários serviços aos humanos e aos outros organismos (Dudgeon et al., 2006). O descarte contínuo de resíduos produzidos por atividades antrópicas e a contaminação destes ecossistemas por poluentes químicos persistentes têm levado à sua acumulação na água, no sedimento e nos organismos que os habitam, frequentemente resultando em toxicidade para os últimos (Amiard-Triquet et al., 2015)

Estudos sobre contaminação ambiental e toxicidade são mais comuns em ambientes aquáticos por estes serem grandes receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, ou depositados no solo ou emitidos no ar, sendo posteriormente incorporados ao ecossistema (Häder et al., 2020). Entre vários contaminantes que podem estar presentes nos ecossistemas aquáticos existem os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos de dois ou mais anéis aromáticos. A maioria possui baixa solubilidade em água, o que permite a sua persistência nos ambientes aquáticos. Os HPAs fazem parte da classe de poluentes orgânicos persistentes (POPs) que são formados por várias substâncias individuais e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivam da fração de petróleo, devido a formações que podem ocorrer com as reações de baixa temperatura e alta pressão a partir de matéria orgânica natural (Douben, 2003). Os HPAs são liberados no ambiente através de incêndios florestais, erupções vulcânicas, matéria orgânica em decomposição ou por ações antrópicas que envolvam combustão ou transporte de compostos contendo HPAs. As emissões por automóveis, os derramamentos acidentais, processos industriais e o aquecimento a gás ou óleo são exemplos destas ações (Kim et al., 2013). Hidrocarbonetos que atingem o ambiente, por exemplo, a partir de derramamentos de óleo, como o impacto do derramamento de óleo da *Deepwater Horizon* que ocorreu em ambientes marinhos, sendo o maior vazamento de óleo da história dos Estados Unidos (Allan et al., 2012). Os HPAs podem persistir em sedimentos durante décadas, e sujeitar o ambiente aquático a efeitos prolongados pela contaminação crônica (Incardona et al., 2005). Dentre os HPAs mais frequentemente encontrados nos ambientes aquáticos, o fenantreno é considerado como prioridade para o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos devido a sua alta toxicidade, abundância, onipresença e persistência no ambiente (Zhang et al., 2014)

A informação disponível até o momento sugere que a exposição de organismos ao fenantreno, e sua bioacumulação, podem ocasionar alterações fisiológicas, alterações comportamentais e impactos sobre o funcionamento do sistema endócrino, comprometendo o desenvolvimento e a sobrevivência das espécies expostas a eles (Alves et al., 2017; Incardona et al., 2005). Entre vertebrados aquáticos, os efeitos biológicos da exposição ao fenantreno foram melhor avaliados em peixes-zebra (*Danio rerio*), demonstrando efeitos como a inibição do desenvolvimento larval (Wu et al., 2022), a diminuição da produção de ovos e dos níveis de estradiol e vitelogenina em fêmeas (Peng et al., 2019) e a diminuição da produção de espermatozoides em machos adultos (Chen et al., 2021). Em um estudo recente utilizando *Danio rerio* como modelo demonstrou que apenas o fenantreno já induz disfunção cardíaca no mesmo grau que misturas complexas de HPAs, há evidências que sugerem que o fenantreno e derivados modulam muitas das principais características cardíacas e vasculares (England et al., 2024). Alguns estudos mostram que o fenantreno pode bioacumular principalmente em invertebrados e peixes, que é avaliada em concentrações elevadas (Armitage et al., 2021).

Entre invertebrados e vertebrados já testados, os anfíbios é um grupo que tem informações limitadas quando expostos a HPAs, especialmente para os neotropicais. O Brasil é o país com maior riqueza de espécies de anfíbios anuros em todo o mundo (Segalla et al., 2021), e a maioria das espécies desta ordem possui um estágio larval aquático, conhecida popularmente como girino (Kloh, 2022). Anfíbios são o grupo de vertebrados com a maior proporção de espécies alocadas em alguma categoria de ameaça à conservação, sendo a perda de habitat, a poluição dos corpos d'água e as mudanças climáticas consideradas as principais causas relacionadas ao declínio de suas populações (Alford et al., 1999; Clulow et al., 2014).

O ciclo de vida bifásico dos anfíbios faz com que eles estejam expostos a uma grande variedade de contaminantes e estressores ambientais, sendo suas formas larvais mais suscetíveis à contaminação por poluentes, uma vez que sua pele é altamente permeável e que seu desenvolvimento acontece em águas superficiais (Jones-Costa et al., 2018). Entre os principais contaminantes presentes na água onde estes organismos podem se desenvolver, destacam-se os metais pesados, os pesticidas, fertilizantes, fármacos e hidrocarbonetos (Sievers et al., 2019). Quando estas diferentes moléculas contaminam ecossistemas aquáticos e são bioacumuladas podem causar efeitos sobre o desenvolvimento larval e afetar o recrutamento das populações de anfíbios (Hayes et al., 2010; Slaby et al., 2019), principalmente daquelas espécies que se reproduzem em corpos d'água pequenos (da Costa Araújo et al., 2020a). Os efeitos da contaminação sobre os anfíbios podem ser avaliados através de vários parâmetros, e alguns protocolos foram criados especialmente para investigá-los durante a fase larval de anuros, como

o FETAX, AMPHITOX e AMPHIEB (Herkovits and Pérez-Coll, 2003; Mouche et al., 2017), testes padronizados que permitem a comparação da toxicidade relativa de vários compostos. Além destes protocolos, estudos laboratoriais independentes podem ser alternativas mais flexíveis, adaptando-se a espécies que ainda não são modelos padronizados de pesquisa. Neste caso também podem ser usados controles adequados às espécies em questão, limitando potenciais fontes de ruído externas sobre os resultados das análises (Sparling et al., 2010b). Isto é especialmente importante em países com alta diversidade de ecossistemas e habitats aquáticos e alta diversidade de espécies de anfíbios, onde mesmo os estágios de desenvolvimento larval da maioria das espécies ainda aguarda descrição formal.

A partir da eclosão, os girinos podem absorver e acumular compostos através das brânquias, pela superfície da pele, bem como através da alimentação e consumo de água (Linder et al., 2010). A absorção destes contaminantes pode causar alterações deletérias nos girinos, que pode ser avaliada por biomarcadores a nível molecular, bioquímico, morfológico e comportamentais (Amiard-Triquet et al., 2012). Os girinos são ótimos modelos biológicos para o monitoramento ambiental aquático, uma vez que é possível encontrá-los em vários tipos de ambientes de água doce e que se deslocam a distâncias relativamente curtas em relação à área de desova, o que os torna animais representativos da área amostrada. Além disso, são relativamente resistentes a variações de fatores abióticos como o pH ou oxigenação (Gomez-Mestre, 2003). Em geral, quando expostos a ambientes com alimento limitado ou osmoticamente inadequado, os girinos tendem a ter o tempo de desenvolvimento encurtado e taxas de crescimento aumentadas, passando pelo processo de metamorfose mais rapidamente se comparados a indivíduos da mesma espécie criados em condições ótimas (Alvarez, 2002; Gomez-Mestre et al., 2010). Entretanto, efeitos de contaminantes no desenvolvimento inicial de anfíbios ainda são pouco estudados. Desta forma, este estudo objetiva investigar os efeitos letais e subletais do HPA fenantreno durante o desenvolvimento larval de uma perereca endêmica do Brasil, *Dendropsophus branneri*, através de uma abordagem experimental.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia é definida como um ramo da toxicologia dedicado a estudar os efeitos agudos ou crônicos dos poluentes sobre os componentes dos ecossistemas e dos organismos, assim como suas respostas à contaminação. A ecotoxicologia também pode ser considerada uma ferramenta de monitoramento ambiental baseada nas respostas de organismos individuais a estressores químicos (Newman, 1994). O componente prático da ecotoxicologia é conhecido como a avaliação de risco ecológico, que se dedica a estimar o risco de uma situação existente e a prever o risco de uma situação futura. A ecotoxicologia aquática estuda os efeitos químicos das atividades antropogênicas em ambientes aquáticos marinhos e dulcícolas em vários níveis de organização, desde estruturas celulares, indivíduos, populações e comunidades (Newman, 2008). A ecotoxicologia pode ser avaliada em uma escala a partir do nível molecular até mais específico em nível de comunidades através dos níveis organizacionais permitindo uma melhor compreensão da toxicidade e o seu mecanismo de ação (Peltzer et al., 2024) (Figura 1).

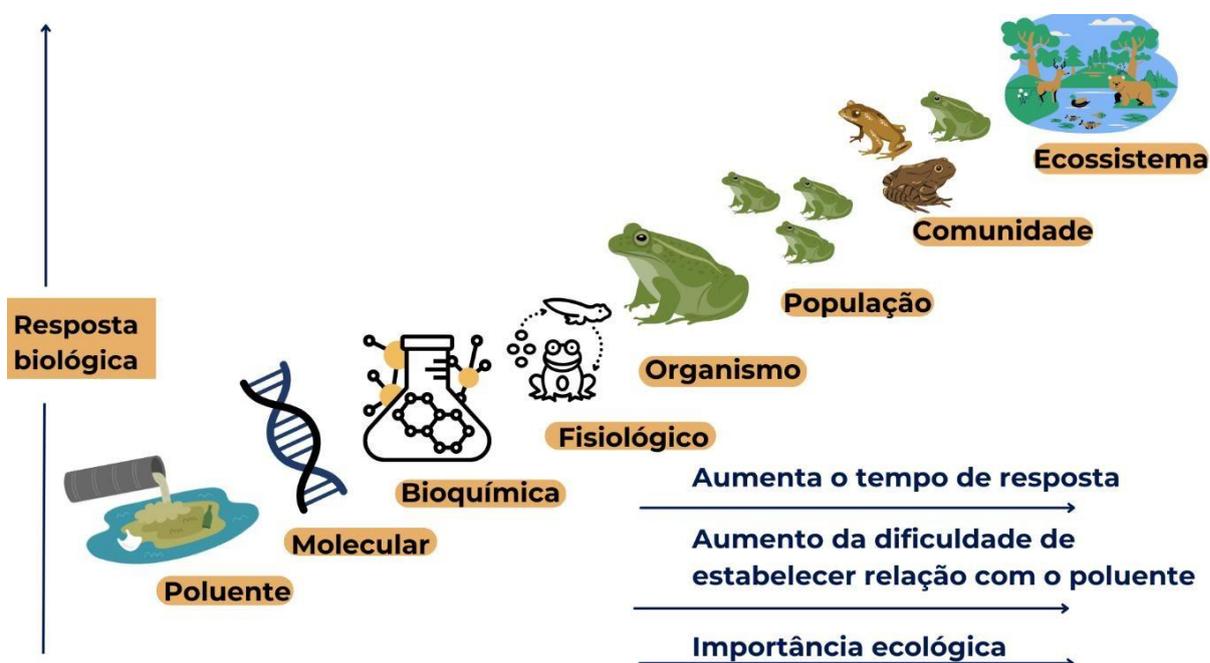


Figura 1: Níveis hierárquicos quanto as respostas ecotoxicológicas medidas em diferentes níveis de organização biológica. Adaptado de (Peltzer et al., 2024).

2.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS, FENANTRENO E SEUS EFEITOS SOBRE VERTEBRADOS AQUÁTICOS

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são moléculas compostas por dois ou mais anéis aromáticos simples ou fundidos a um par de carbono na sua estrutura molecular (Douben, 2003). São encontrados na composição do petróleo bruto, que contém concentrações relativamente altas de naftaleno, fenantreno, antraceno e seus derivados. O fenantreno é um HPA formado por três anéis aromáticos e é geralmente encontrado em maior quantidade por ser termodinamicamente mais estável em relação a outros HPAs (Abdel-Shafy et al., 2016). Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, o fenantreno é o HPA mais abundante nos ambientes aquáticos (Cerniglia, 1993). O fenantreno é um composto sólido, hidrofóbico, de alta persistência e de cor branca, mas solúvel em solventes orgânicos como o álcool etílico, hexano, ácido acético e benzeno. É liberado no ambiente através de derramamentos acidentais de petróleo e derivados por meio de descargas industriais e urbanas, sendo um dos HPAs mais frequentemente encontrados no ambiente aquático, onde pode permanecer por períodos longos, alcançando até algumas décadas (Douben, 2003). Devido a sua toxicidade e resistência à biodegradação, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) classificou o fenantreno entre os 16 HPAs prioritários para estudos de monitoramento (Ramdine, 2012).

Sabe-se, por exemplo, que o fenantreno causa uma diminuição na produção de ovos e nos níveis de testosterona e estradiol em peixe-zebra *Danio rerio* (Peng, 2019), com a diminuição da produção de espermatozoides em machos adultos (Chen et al., 2021). Formações anormais durante o desenvolvimento da concha e manto, e baixos níveis de cálcio, também foram detectados em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao fenantreno (Nogueira et al., 2017). Em *Daphnia magna* um crustáceo bentônico testado durante 96h exposto ao fenantreno foi mais sensível que outros invertebrados também analisados (Wu et al., 2015a). Entretanto, tendo em vista o potencial do fenantreno de causar efeitos subletais a nível crônico em concentrações bem mais baixas, tem sido estabelecidos critérios de qualidade de água (concentrações máximas de poluentes em ambientes aquáticos que se presume não afetarão os organismos e suas funções após exposição de longo ou curto prazo) da ordem de $51 \mu\text{g L}^{-1}$ para ambientes aquáticos de água doce (Wu et al., 2015a) e de $39 \mu\text{g L}^{-1}$ para ambientes aquáticos marinhos (Qin et al., 2022). Os efeitos da exposição da fase larval de anfíbios ao fenantreno foram muito pouco estudados, com um único relato de sensibilidade expressa pela concentração de fenantreno na água letal a 50% dos organismos testados após 96h de exposição (CL50) para

girinos da espécie asiática *Euphlyctis cyanophlyctis* igual a 12.280 mg/L fenantreno L⁻¹. Entretanto, o valor relatado para a CL50 é questionável tendo em vista a solubilidade do fenantreno em água ser 10 x menor que a reportada neste estudo. Efeitos letais ou subletais da exposição ao fenantreno em outras espécies de anfíbios anuros são ainda desconhecidos (Bhuyan et al., 2020a).

2.3 ANFÍBIOS COMO ESPÉCIES MODELO EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

Em seus estágios iniciais de desenvolvimento larval, os anfíbios são mais sensíveis a poluentes, enquanto em estágios de desenvolvimento mais avançados podem ser mais resistentes a certos contaminantes (Bridges, 2000; Howe et al., 1998). Girinos possuem uma taxa de captação mais rápida de xenobióticos que adultos e ocupam posições tróficas inferiores, sendo predados por vários organismos (Abercrombie et al., 2019). Estes aspectos podem facilitar uma aceleração de processos de biomagnificação no caso de sua exposição a contaminantes com evidência de serem biomagnificáveis como o perfluorooctano sulfonato (PFOS) e o ácido perfluorooctanóico (PFOA), aumentando o potencial de transferência trófica de substâncias químicas em redes tróficas que tenham girinos como elos (Abercrombie et al., 2019).

Girinos de *Boana faber* foram utilizados como organismos modelo em ensaios de exposição a fungicidas utilizados no cultivo de arroz. Durante a reprodução, fêmeas de *B. faber* colocam uma grande quantidade de ovos em uma desova, variando de 3.000 a 4.000, e os girinos são longevos, tolerantes a condições laboratoriais e têm grande massa corporal, favorecendo a quantificação da atividade de enzimas (Warsneski et al., 2024). Girinos de *Physalaemus cuvieri*, uma espécie de rã pequena, com ampla distribuição geográfica no Brasil e capaz também de produzir muitos ovos, vêm sendo utilizados em ensaios toxicológicos com foco em microplásticos que revelaram, por exemplo, que o polietileno se acumula no fígado, induzindo hepatotoxicidade (da Costa Araújo et al., 2020b). O que torna os girinos são ótimos modelos para a investigação de contaminantes químicos ou estressores ambientais devido a seu tamanho pequeno, fácil coleta, elevada abundância local, tempo de desenvolvimento relativamente curto, plasticidade fenotípica, ausência de dimorfismo sexual e pela facilidade de manuseio em seu ambiente nativo ou em ambiente de laboratório com condições controladas, o que torna possível o estudo de processos biológicos complexos e de interações com a poluição (Costa et al., 2024a).

2.4 ESPÉCIE DO ESTUDO

Dendropsophus branneri (Cochran, 1948) (Figura 2) é um anfíbio anuro pertencente à família Hylidae com cerca de 1,8 cm de comprimento rostro-cloacal em sua fase adulta, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo ao longo da costa brasileira, desde o estado do Maranhão até o Rio de Janeiro e presente nos biomas da Caatinga e Mata Atlântica (Lutz, 1973). Sua dieta é composta basicamente de mosquitos e moscas (Diptera), além de larvas de borboletas e mariposas (Lepidoptera) (Castro et al., 2016; Santos et al., 2004). É encontrada em poças temporárias e permanentes, a partir de onde os machos adultos vocalizam, geralmente posicionados sobre as folhas e talos de plantas aquáticas (Lutz, 1973). Normalmente, as fêmeas depositam os ovos diretamente na coluna d'água destes ambientes, caracterizado como o Modo Reprodutivo 1 de anfíbios, segundo a classificação de (Haddad et al., 2005). O girino de *D. branneri* é nectônico, ou seja, habita o meio da coluna d'água, e tem o corpo em forma de violino, alongado em vista dorsal e ligeiramente deprimido em vista lateral. A largura do corpo (excluindo a cauda) equivale a cerca da metade de seu comprimento (De Abreu et al., 2015) Como observado em outras espécies de *Dendropsophus* do grupo *D. microcephalus*, os girinos de *D. branneri* são caracterizados pela falta de fileiras de dentes labiais e de papilas marginais no disco oral (Faivovich et al., 2005). Os ovos normalmente têm cor preta e permanecem agrupados no ambiente aquático, envolvidos por uma massa gelatinosa e incolor (Baracho, 2015).

Dendropsophus branneri é uma espécie localmente abundante, normalmente produzindo desovas com um número relativamente grande de ovos, variando de 125 a 288 ovos por desova (Baracho, 2015). Seu modo reprodutivo implica em um desenvolvimento larval que ocorre completamente em ambientes lênticos permanentes ou com longo hidroperíodo, em paisagens nativas, rurais ou antropizadas, tornando a espécie potencialmente suscetível a efeitos crônicos pela contaminação por uma grande variedade de substâncias químicas, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de petróleo.



Figura 2: *Dendropsophus branneri* em vida. Esquerda: Vista lateral de um girino no estágio de desenvolvimento 37 de Gosner. Centro: Vista dorsolateral de um imago. Direita: Vista dorsolateral de uma fêmea adulta. Fotos: Natallia Vívian e Pedro Ivo Simões.

2.5 BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

As respostas moleculares, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas ou comportamentais dos organismos frente à exposição a contaminantes tem sido definidas como biomarcadores em Ecotoxicologia (Depledge et al., 1995). Biomarcadores refletem perturbações ao metabolismo e são úteis em várias etapas do processo de avaliação de risco, fornecendo informações sobre o efeito da exposição e tendo como propósito permitir o planejamento de estratégias a fim de evitar que os efeitos da contaminação alcancem níveis irreversíveis de dano aos organismos e as populações (Fernandes, 2020; Van der Oost et al., 2003). Os biomarcadores bioquímicos são tipicamente sensíveis a vários contaminantes, apresentando potencial especificidade e fornecendo informações sobre o mecanismo de efeito tóxico relacionado ao poluente estudado (Van der Oost et al., 2003).

2.5.1 BIOMARCADOR MORFOLÓGICO

Parâmetros como medidas de comprimento do corpo, peso corporal, estimar a inibição ou aceleração do desenvolvimento até a metamorfose são respostas importantes para estudos dos organismos em função do crescimento (Peltzer et al., 2024). Para girinos, é possível obter as medidas através de microscópio estereoscópico equipado com câmera ou utilizar ferramentas manuais como o paquímetro. Várias mudanças como o peso, comprimento e anormalidades foram possíveis ser observadas em larvas expostas a algum contaminante (Cuzziol Boccioni et al., 2021; da Costa Araújo et al., 2020a; Peltzer et al., 2013). As mudanças morfológicas podem ser definidas como erros de desenvolvimento que resultam em modificações assimétricas ou anormalidades das estruturas corporais (Salla et al., 2024; Sodré et al., 2022). Além das respostas morfológicas em anfíbios serem importantes para os estudos ecotoxicológicos, pois representam biomarcadores morfológicos de nível individual (Salla et al., 2024).

2.5.2 BIOMARCADOR ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE - Glutathione S-transferase (GST)

A atividade das enzimas antioxidantes pode ser aumentada ou diminuída pela exposição a poluentes, o que pode depender da concentração do contaminante e da duração da exposição (Coltro et al., 2017). A Glutathione S-transferase (GST) é uma enzima de biotransformação da fase II, com papel de desintoxicação. É encontrada no citosol das células e catalisa a reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH). A GST fornece proteção celular contra efeitos tóxicos causados por uma grande variedade de componentes químicos e de alterações do ambiente do organismo, sendo também específica quanto ao substrato, uma vez que diferentes compostos xenobióticos e produtos reativos de processos intracelulares podem atuar como substrato para a GST (Di Giulio and Meyer, 2008). O processo de biotransformação de contaminantes pode ser dividido em três fases: na Fase I, enzimas do Citocromo P450, responsáveis por reações de oxidação, redução e hidrólise, adicionam grupos funcionais e aumentam a reatividade das moléculas químicas de contaminantes. Na Fase II, acontecem reações de conjugação destes contaminantes com moléculas endógenas como a glutathione, aumentando sua solubilidade em água, e durante a fase III ocorre a excreção para fora da célula dos compostos que foram metabolizados (Schlenk et al., 2008). Em anfíbios, o aumento da atividade da GST pode indicar um mecanismo de resposta para conter o estresse oxidativo em tecidos do organismo (Coltro et al., 2017), também pode estar relacionado à resistência destes animais à toxicidade de metais pesados e outros contaminantes.

2.5.3 BIOMARCADOR ENZIMÁTICO DE NEUROTOXICIDADE – ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A acetilcolina é um neurotransmissor primário presente no sistema nervoso central e periférico dos vertebrados, atuando no sistema nervoso autônomo (Picciotto et al., 2012). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que decompõe a acetilcolina na junção neuromuscular e sua ausência leva ao acúmulo de acetilcolina nestas regiões (Silman et al., 2008). Conseqüentemente, o ciclo de excitação-contração-relaxamento é interrompido, levando à alteração do desempenho contrátil muscular (Tintignac et al., 2015). Diazinon, um inseticida, foi testado em girinos de *Scinax fuscovarius*, onde a AChE aumentou nos estágios iniciais dos girinos, se mostrou um sensível biomarcador pesticida organofosforado (Leite et al., 2010). A enzima atua também no controle das funções locomotoras e sua inibição perturba a

neurotransmissão, especialmente nos músculos, afetando o desempenho locomotor, como já visto, por exemplo, em girinos de *Xenopus laevis* (Boualit et al., 2023)

2.5.4 BIOMARCADOR DE DEFESA ANTIOXIDANTE - CATALASE (CAT)

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante presente nos peroxissomos de células animais e vegetais. Sua principal função é degradar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa de oxigênio (RO), em água (H_2O) e oxigênio (O_2), esse processo pode oxidar ácidos graxos e causar danos celulares (Di Giulio and Meyer, 2008). A CAT tem papel importante no controle do estresse oxidativo e em diversas funções fisiológicas (Van der Oost et al., 2003). Inclusive, torna-se um bom biomarcador para sensível em exposições de girinos aos metais, vários estudos já foram realizados e evidenciando o seu aumento (Boiarski et al., 2020; Fernandes et al., 2021; Ossana et al., 2013). Girinos de *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) expostos a hidroxiclороquina e azitromicina apresentaram aumento da atividade da CAT e da superóxido dismutase (SOD), possivelmente levando a uma redução das EROs (da Luz et al., 2021).

2.6 BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS

O estudo de biomarcadores comportamentais é um campo da ecotoxicologia dedicado a avaliar as respostas dos organismos expostos à contaminação a partir da observação e mensuração de comportamentos, servindo como um elo entre os processos fisiológicos e ecológicos, e sendo eficaz na avaliação da sensibilidade dos organismos e na avaliação de risco ecológico (Amiard-Triquet, 2009; Scott & Sloman et al., 2004). Por exemplo, entre organismos aquáticos, a atividade natatória é uma variável de resposta operacional comum, sendo considerada de grande relevância (Grillitsch et al., 1999; Little et al., 1990), sendo também possível se relacionar diretamente com a sobrevivência dos organismos, uma vez que influencia as relações entre predadores e presas (Domenici et al., 2007).

Parâmetros comportamentais como a atividade natatória fornecem informações sobre os efeitos subletais imediatos e efeitos de longo prazo na aptidão dos organismos (Amiard-Triquet, 2009). Em girinos ou em anfíbios adultos, as alterações comportamentais podem aparecer quando estes se desenvolvem no meio contaminado ou quando são expostos brevemente a contaminantes. A mensuração destes parâmetros e a detecção de alterações podem ser feitas através de observações visuais diretas, de análises de fotografias em sequência ou de gravações

de vídeos. A partir das últimas, é possível quantificar, por exemplo, outras variáveis relacionadas à locomoção, como a velocidade média, a velocidade máxima e a distância percorrida pelo organismo. Em algumas abordagens computacionais baseadas em imagens de vídeo, os organismos focais filmados e a área da cena são transformados em pixels e seu movimento pode ser mensurado ao longo do espaço e do tempo (Denoël et al., 2013), e as alterações de comportamento em resposta a diferentes grupos experimentais podem ser quantificadas.

Estudos que já utilizaram esta abordagem sobre girinos mostraram, por exemplo, que a exposição ao cobre reduziu a atividade de natação enquanto temperaturas acima da média de 22°C aumentaram a atividade natatória de girinos de *Lithobates sylvaticus* respostas que culminaram num aumento de 3x no número de ataques de um predador modelo aos girinos na temperaturas elevadas e exposição ao cobre (Hayden et al., 2015), O herbicida glifosato diminuiu a atividade de natação e aumentou o tempo dentro de esconderijo em girinos de *Rana dalmatina* (Mikó et al., 2017). Apesar de haver significativa variabilidade em respostas comportamentais, dificultando a detecção de diferenças significativas, resultados de estudos comportamentais são importantes porque nos permitem inferir sobre as implicações ecológicas dos efeitos da contaminação (Sievers et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição da fase inicial de desenvolvimento de *Dendropsophus branneri* ao fenantreno dissolvido na água sobre efeitos letais e subletais no desenvolvimento larval utilizando biomarcadores morfológicos, bioquímicos e comportamentais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a concentração de fenantreno dissolvido na água letal a 50% das larvas iniciais de *D. branneri* expostas por 15 dias a diferentes concentrações de fenantreno;
2. Avaliar as concentrações de fenantreno dissolvido na água que causam atraso no desenvolvimento, alterações no peso úmido e comprimento dos girinos expostos por 15 dias e por 60 dias;

3. Avaliar as concentrações de fenantreno dissolvido na água que causam alterações na atividade das enzimas acetilcolinesterase, glutathione S-transferase e catalase nos girinos expostos por 15 dias;

4. Avaliar as concentrações de fenantreno dissolvido na água que causam alterações na velocidade natatória média e trajetória de natação nos girinos expostos por 15 dias.

4. CAPÍTULO ÚNICO

ARTIGO: Biochemical, developmental and behavioral effects of phenanthrene during early development of tree frog *Dendropsophus branneri* (Cochran, 1948)

Natallia Vívian Nascimento da Silva Maia^{1,2,3}, Pedro Ivo Simões^{1,2} Paulo Sérgio Martins de Carvalho^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

² Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo gráfico



Palavras-chave

Anfíbios; Biomarcadores; Ecotoxicologia; HPA's; Poluição aquática.

4.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as populações de anfíbios têm sofrido declínios populacionais, resultando em muitas espécies serem classificadas em alguma categoria de ameaça (Afonso et al., 2022). Este declínio é atribuído a diversos fatores, como a perda de habitats, alterações climáticas, propagação de doenças e a poluição em corpos d'água (Linke, 2022). Os poluentes presentes no ambiente aquático podem afetar significativamente os girinos, que representam a fase larval aquática para a maioria das espécies dos anuros (Kloh, 2022). Esses poluentes podem ser absorvidos e se acumular neles, através das brânquias, pela superfície da pele, bem como através da alimentação e do consumo de água (Dong et al., 2024). Devido a essas características, os girinos são bons modelos biológicos para o monitoramento de ecossistemas aquáticos, potencialmente respondendo até a níveis baixos de contaminação (Hopkins, 2007). Além disso, os girinos da maioria das espécies são localmente abundantes e a facilidade de mantê-los em condições laboratoriais tornam-se ideias para testes ecotoxicológicos (Costa et al., 2024b).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos com dois ou mais anéis aromáticos simples ou fundidos a um par de carbono em sua estrutura molecular (Sahoo et al., 2020). São um grupo de poluentes que nos últimos anos se tornaram foco de preocupação em relação a seus impactos ambientais, uma vez que sua liberação em diversos ecossistemas se tornou mais frequente em decorrência do aumento da urbanização e crescimento de cadeias produtivas envolvendo o uso de petróleo bruto e derivados (Douben, 2003). Os HPAs se originam da combustão incompleta de combustíveis orgânicos como o carvão, a madeira e o petróleo bruto. Podem ter origem a partir de atividades antrópicas, por exemplo, associadas às indústrias de tabaco, asfalto, alumínio e a atividades relacionadas à extração, refino e distribuição do petróleo (Abdel-Shafy et al., 2016).

Dentre os HPAs mais frequentemente encontrados nos ambientes aquáticos, o fenantreno é considerado como prioridade para o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos devido a sua alta toxicidade, abundância, onipresença e persistência no ambiente (Zhang et al., 2014). O fenantreno é um dos HPAs mais frequentemente encontrados em ambientes aquáticos, os quais atinge através do derramamento ou escoamento acidental do petróleo ou de seus derivados, ou por meio de descargas industriais e urbanas (Mojiri et al., 2019). A contaminação do ambiente aquático pelo fenantreno pode ter efeitos letais ou subletais sobre invertebrados e vertebrados aquáticos (e.g., nemátodes – (Pontes et al., 2021), peixes (Sun et al., 2006).

Não há muitos estudos sobre os efeitos do fenantreno em anfíbios durante sua fase larval aquática, quando são mais sensíveis a contaminantes (Bridges, 2000). Um estudo recente

evidenciou alterações na atividade de enzimas antioxidantes e efeitos genotóxicos em girinos da espécie asiática *Euphlyctis cyanophlyctis* expostos ao fenantreno testados por 96h de exposição em que a (CL50) igual a 12.280 mg/L fenantreno, em que no mesmo estudo (Bhuyan et al., 2020b). Além disso, girinos de *Xenopus laevis* e *Pelophylax perezi* foram expostos a concentrações de fenantreno de 20.3 e 30.5 mg/L sendo observadas malformações como edemas, cauda curvada, sangramento interno e grânulos brancos (Rusković, 2021a).

O presente estudo avaliou a toxicidade do fenantreno em girinos de *Dendropsophus branneri* (Cochran, 1948), uma espécie de perereca pertencente à família Hylidae, neotropical, endêmica dos biomas Mata Atlântica e Caatinga no Brasil (Frost, 2024). A espécie habita a vegetação herbácea e arbustiva às margens de lagos, lagoas ou de poças temporárias com longo hidroperíodo. As fêmeas depositam os ovos diretamente na coluna d'água, onde os girinos eclodem e completam seu crescimento e desenvolvimento até a metamorfose (Lutz, 1973). Devido à sua ampla distribuição geográfica e ocorrência em ambientes nativos, rurais e urbanos, *D. branneri* está potencialmente sujeita a ambientes contaminados por fenantreno e outros HPAs, sendo um bom modelo de estudo para avaliações dos potenciais efeitos do fenantreno sobre o desenvolvimento larval de espécies de anuros distribuídas nos mesmos biomas. Este é o primeiro estudo a avaliar como o fenantreno pode afetar o desenvolvimento larval de uma espécie de anuro neotropical. Nossas hipóteses foram que a exposição ao fenantreno em concentrações ambientalmente relevantes resultaria em aumento da taxa de mortalidade, atraso no desenvolvimento larval, redução no crescimento em peso e comprimento, e alterações dos níveis de biomarcadores enzimáticos glutathiona-S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE) e catalase (CAT). Também esperávamos observar mudanças na velocidade natatória e na trajetória de natação dos girinos expostos. Para testar essas hipóteses, utilizamos uma abordagem experimental baseada na exposição de girinos a concentrações de fenantreno variando de 10,8 a 279,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ e na avaliação de seus efeitos.

Nossos resultados mostraram que a exposição ao fenantreno causou mortalidade, atraso no desenvolvimento larval em exposições de 15 e 60 dias, redução no ganho da biomassa e comprimento total e indução das enzimas GST, AChE e CAT, mesmo a partir das concentrações mais baixas. Estes achados são inéditos para uma espécie neotropical, destacando a importância de considerar a toxicidade do fenantreno mesmo em concentrações ambientalmente relevantes para avaliações de qualidade da água.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e manutenção de ovos fertilizados

Machos e fêmeas adultos de *Dendropsophus branneri* foram coletados entre março e julho 2023, em uma área verde do Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na cidade de Recife, estado de Pernambuco, Brasil (08°02'51.98" S, 34°57'09.70" W). Os indivíduos foram encontrados por quatro buscas visuais ativas realizadas durante a noite ao longo das margens de um lago com cerca de 14.000 m² de superfície. Durante as buscas, procuramos por fêmeas portando ovos maduros (visíveis através da pele), machos em atividade de vocalização ou casais já em amplexo. Os indivíduos encontrados foram capturados manualmente e acondicionados em sacos plásticos de 5 L, contendo um macho e uma fêmea cada, além de cerca de 100 mL de água do próprio lago e um pouco de vegetação coletada no ponto de captura, para estimular a oviposição. Os casais foram transportados até o Laboratório de Herpetologia da UFPE onde foram mantidos na temperatura de 25 a 27 °C ao longo da noite, até a oviposição. Casais que não geraram desovas foram mantidos por 24 h e devolvidos ao seu local de origem na noite seguinte à sua captura. No primeiro experimento foram obtidas três desovas de três casais e no segundo experimento cinco desovas de cinco casais. Os primeiros casais que produziram ovos fecundados foram posteriormente anestesiados e mortos com solução tópica de lidocaína (50 mg g⁻¹), fixados em solução de formol a 10%, preservados em solução de etanol 70% e depositados na Coleção Herpetológica da UFPE como espécimes-testemunho (CHUFPE A-2034–A-2041 e A-2072–A-2077).

Desovas fecundadas foram transferidas para potes plásticos transparentes de 3,6 L, contendo 600 mL de água limpa (pH 7,1 ± 0,5, condutividade 1,14 ± 0,2 mS/cm, oxigênio dissolvido maior que 5 mg L⁻¹) e transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da UFPE. Os ovos com embriões vivos foram aclimatados às condições de laboratório em aquários contendo 15 L de água limpa à temperatura de 27,0 °C, com 5 L de renovação de água limpa a cada 24h e aeração constante. Dentro de sete aquários de exposição, quando atingiram estágio 25 de Gosner (Gosner, 1960) foram distribuídos em 12 béqueres plásticos de 100 mL de capacidade com uma abertura lateral de 5 x 5 cm coberta por uma tela de polipropileno de 2 mm de abertura para melhor circulação da água, dispostos no fundo do aquário. Cada béquer continha entre 5-10 larvas, vindos de pelo menos duas desovas distintas. Após a eclosão, os girinos foram alimentados uma vez ao dia com 5 mL de um concentrado de náuplios de *Artemia* recém-eclodidos, até atingirem o estágio de desenvolvimento 25 de Gosner aproximadamente cinco dias após a eclosão, quando foram transferidos para béqueres semelhantes utilizados nos

experimentos de exposição. O estudo teve por objetivo determinar a concentração letal do fenantreno a 50% dos organismos expostos (CL_{50}) após exposição por 15 dias às concentrações utilizadas, e avaliar efeitos subletais na velocidade do desenvolvimento, no crescimento em peso e comprimento, nos biomarcadores enzimáticos glutationa-S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE) e catalase (CAT), na velocidade natatória e trajetória de natação. Além disso, também foi realizada uma exposição por 60 dias a concentrações subletais para avaliar efeitos na velocidade do desenvolvimento.

4.2.2 Preparo das soluções de fenantreno e desenho experimental das exposições

Uma massa de 0.7500 g de fenantreno $C_{14}H_{10}$; CAS Number: 85-01-8 (98% puro, Sigma Aldrich) foi pesada e dissolvida volumetricamente em 0,05 L de dimetilsulfóxido (DMSO) (99% puro), criando uma solução estoque 1 de $15 \mu\text{g fenantreno } \mu\text{L}^{-1}$. Esta solução estoque 1 foi diluída com DMSO para criar as soluções estoque 2, 3, 4 e 5 nas concentrações de 10, 5, 1 e $0,5 \mu\text{g fenantreno } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente. Para o preparo das soluções de exposição nos aquários, um volume de $61,2 \mu\text{L}$ de cada uma destas soluções estoque de fenantreno (1 a 5) foi adicionado com micropipetas a um volume de água limpa de 3,06 L já colocado previamente nos aquários de exposição, resultando nas concentrações nominais de exposição de 10, 20, 100, 200 e $300 \mu\text{g fenantreno } \text{L}^{-1}$, respectivamente. Também foram preparados aquários para os grupos experimentais como o controle (água limpa) e controle de solvente (DMSO 0,002% v/v).

A água dos aquários foi trocada totalmente a cada 24 h, repetindo o mesmo procedimento de pipetagens descrita acima para preparar soluções de exposição novas nas concentrações mencionadas. Cada grupo experimental foi mantido em um aquário contendo 6 béqueres com volume de 50 mL com 5 girinos, totalizando 30 indivíduos no estágio Gosner 25 para cada grupo experimental ao início da exposição. As concentrações de fenantreno nos aquários de exposição foram confirmadas através do método de fluorescência fixa utilizando um espectrofluorímetro Spectramax M3 (Molecular Devices, EUA), e os pares de excitação/emissão 260/380 nm para quantificação do fenantreno dissolvido na água por fluorescência (Torreiro-Melo et al., 2015). A cada dia, amostras de água dos aquários de exposição com solução nova após a troca de água e colocação das soluções estoque de fenantreno foram lidas em cubetas de quartzo, em duplicata, e as concentrações calculadas com base em uma curva analítica para o fenantreno com 8 pontos entre 0 e $1000 \mu\text{g fenantreno } \text{L}^{-1}$, descrita pela equação:

Y (Fluorescência) = 0,78 X (concentração de fenantreno em $\mu\text{g L}^{-1}$), $R^2 = 0,99$.

As concentrações médias quantificadas nos aquários de exposição ao longo do experimento foram iguais a 10,8, 18,6, 76,2, 187,7 e 279,6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A temperatura da água ao longo do experimento foi mantida em $27,0 \pm 0,5$ °C e o fotoperíodo em 12h/12h claro-escuro. Os girinos nos diferentes béqueres de cada grupo experimental foram inspecionados diariamente para a contagem de girinos sobreviventes e para o recolhimento de girinos mortos. Girinos mortos recolhidos ao longo do experimento foram preservados em solução de formol a 10%. Após a troca de soluções diariamente, os girinos foram alimentados uma vez ao dia com 5 mL de um concentrado de náuplios de *Artemia* recém-eclodidos, por um período de 15 ou 60 dias a partir do início da exposição.

No segundo experimento foi realizado exclusivamente para avaliar atrasos no desenvolvimento ao longo de uma exposição longa por 60 dias, tendo sido utilizadas as mesmas estratégias de exposição e alimentação dos girinos, e as concentrações utilizadas e aferidas foram iguais a 10,8, 18,6, 76,2 e 187,7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Grupos de 10 girinos em 5 béqueres para cada grupo experimental foram utilizados neste experimento, a variação do n de indivíduos em béqueres foi devido a quantidade de ovos obtidos por desova a cada experimento.

4.2.5 MASSA E COMPRIMENTO

Os indivíduos que sobreviveram ao longo da exposição foram anestesiados em água com gelo a 4°C por 5 min, secos em papel toalha e pesados individualmente em uma balança analítica (modelo AY220, precisão 0.0001 g). Após a pesagem, os girinos foram fotografados sob lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000 conectada a uma câmera, e seu comprimento total (CT – medido da ponta do focinho à ponta da cauda) foi calculado a partir das fotografias no software Zeiss Axio Vision versão 4.8. Após estes procedimentos os girinos foram preservados em ultrafreezer a -80° C para análises bioquímicas posteriores.

4.2.3 DESENVOLVIMENTO LARVAL

A partir do início do experimento, os girinos em cada grupo experimental foram examinados diariamente sob microscópio estereoscópico (Zeiss® Stemi 2000) para aferição do estágio de desenvolvimento, de acordo com a classificação de Gosner (1960). Para isto, os girinos em cada becker eram temporariamente transferidos para placas de Petri contendo água limpa utilizada nos experimentos e devolvidos rapidamente ao seu béquer após a aferição que a cada dia levava em média três horas.

4.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Homogenatos S9 para cada amostra dos diferentes grupos experimentais foram preparados a partir de um *pool* de três girinos colocados em um microtubo de 1,0 mL e homogeneizados com 100 μ L de tampão fosfato de potássio (KPI 0,25 M com pH 7,4) mantido em gelo, seguido de centrifugação por 4 min a 9.000 xG em centrífuga refrigerada a 4 °C, sendo separado o sobrenadante. A quantificação das proteínas totais em cada amostra utilizada nos ensaios enzimáticos foi realizada pelo método de (Bradford, 1976). Os homogenatos S9 foram utilizados para todos os testes enzimáticos. A leitura de absorbância foi realizada utilizando 595 nm e 450 nm. A razão entre os valores obtidos em ambos os comprimentos de onda é aplicada em uma curva analítica expressando a relação entre as razões de absorbância (eixo X) e as concentrações de albumina bovina (BSA \geq 96% pureza, Sigma Aldrich), ($R^2 > 0.99$). As leituras de absorbância para os ensaios bioquímicos foram feitas num espectrofluorímetro Spectramax M3 (Molecular Devices, EUA).

4.2.7 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

Homogenatos S9 para cada amostra dos diferentes grupos experimentais foram utilizados para a quantificação da atividade da GST por método adaptado para microplaca (Habig et al., 1974). A atividade da GST foi determinada a partir da conjugação da glutationa (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), produzindo um composto que pode ser detectado por medidas de absorbância a 340 nm. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e a GST expressa em nmol de CDBN $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

4.2.8 ACETILCOLINESTERASE

Homogenatos S9 de cada amostra utilizada foram diluídos 1:10 para a quantificação da atividade da acetilcolinesterase (Ellman et al., 1961) adaptada para microplacas. O princípio do método se baseia na quantificação da cor amarelada produzida pela tiocolina quando reage com o Ditiobisnitrobenzato (DTNB), formando o TNB quantificado por absorbância no comprimento de onda de 415 nm. O cálculo da atividade da AChE foi baseado no coeficiente de absorvidade molar $15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade foi expressa em nmol TNB $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

4.2.9 CATALASE

Homogenatos S9 de cada amostra utilizada foram diluídos 1:4 para quantificação da catalase (CAT) pela leitura do consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seguindo o método de (Beers and Sizer, 1952) adaptado para microplacas por (Li and Schellhorn, 2007). A reação

foi quantificada por leitura de absorbância a 240 nm. A atividade foi calculada mediante coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de decomposição de consumo do peróxido de hidrogênio, e a CAT expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

4.2.4 VELOCIDADE NATATÓRIA E TRAJETÓRIA DE NATAÇÃO

Aos 12 dias após o início da exposição a cada grupo experimental, dez girinos de cada grupo experimental foram submetidos a ensaios para avaliar potenciais efeitos da exposição do fenantreno sobre sua motilidade. Os ensaios ocorreram em um mesmo dia, no período da tarde das 14:00–17:00 h. Os girinos foram transferidos para placas plásticas com seis poços com 3,5 cm de diâmetro e 3,5 cm de altura, contendo 5,0 mL de água limpa. As condições de temperatura e iluminação foram idênticas àquelas dos aquários experimentais. Cada placa recebeu dois girinos de cada grupo experimental (um por poço), e os dois indivíduos de cada placa foram filmados simultaneamente. Após um período de aclimação de 5 min, a atividade dos girinos foi filmada durante cinco minutos com uma câmera de vídeo Intelbras VP600H com lentes de distância focal de 60 mm posicionada 15 cm acima da placa de teste. Os vídeos resultantes foram gravados em computador através de placa de captura Geovision GV900A. A partir dos vídeos a velocidade média (cm s^{-1}) foi calculada pelo *software* de rastreamento de vídeo Spontaneous Motor Activity Recording & Tracking Smart (PanLabs, Harvard Apparatus, EUA). Para esta variável, foi considerado o valor médio da velocidade natatória em cm.s^{-1} ao longo dos 5 min de gravação. Adicionalmente, mapas de trajetória de natação foram gerados a partir das gravações, através da função Tracking do programa.

4.2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A CL_{50} do fenantreno para girinos de *Dendropsophus branneri* após 15 dias de exposição foi estimada a partir das taxas de mortalidade acumuladas de girinos expostos aos diferentes grupos experimentais. O cálculo da CL_{50} foi feito através de regressão dos dados de mortalidade em função das concentrações de exposição pelo modelo logístico usando o pacote de análise dose resposta *drc* no software R versão 4.22 (Ritz et al., 2016).

A análise de diferenças no desenvolvimento dos girinos quantificado pelo estágio Gosner em função das diferentes concentrações (fator 1) e tempos de exposição (fator 2) foi feita por análise de variância de 2 vias (ANOVA 2-way). Quando foram encontradas diferenças, o teste de Dunnet foi utilizado para avaliar diferenças comparadas ao controle.

Os biomarcadores bioquímicos GST, AChE e CAT, peso total, comprimento total e velocidade natatória foram analisados por análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn para avaliar diferenças comparadas ao controle quando foram detectadas diferenças, com o software *SigmaPlot* 12.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Estes dados foram organizados no pacote *tidyverse* (Wickham et al., 2019) e os gráficos foram elaborados utilizando o pacote *ggplot2* para R (Wickham, 2016).

5. RESULTADOS

5.1 TAXAS DE LETALIDADE DURANTE A EXPOSIÇÃO AO FENANTRENO E CL₅₀

A exposição de girinos de *Dendropsophus branneri* a concentrações crescentes de fenantreno dissolvido na água gerou taxas de mortalidade que se adequaram ao modelo logístico, permitindo que fosse estimada a CL₅₀ após 15 dias de exposição (CL₅₀_{15dias}) igual a $154,8 \pm 42 \mu\text{g L}^{-1}$ (estimativa \pm erro padrão), com limites fiduciais inferior e superior de 38,5 e $271 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 3). As taxas de mortalidade ao longo dos dias de exposição nas diferentes concentrações, também estão apresentadas, bem como as estimativas da CL₂₀ a CL₈₀ pelo modelo logístico.

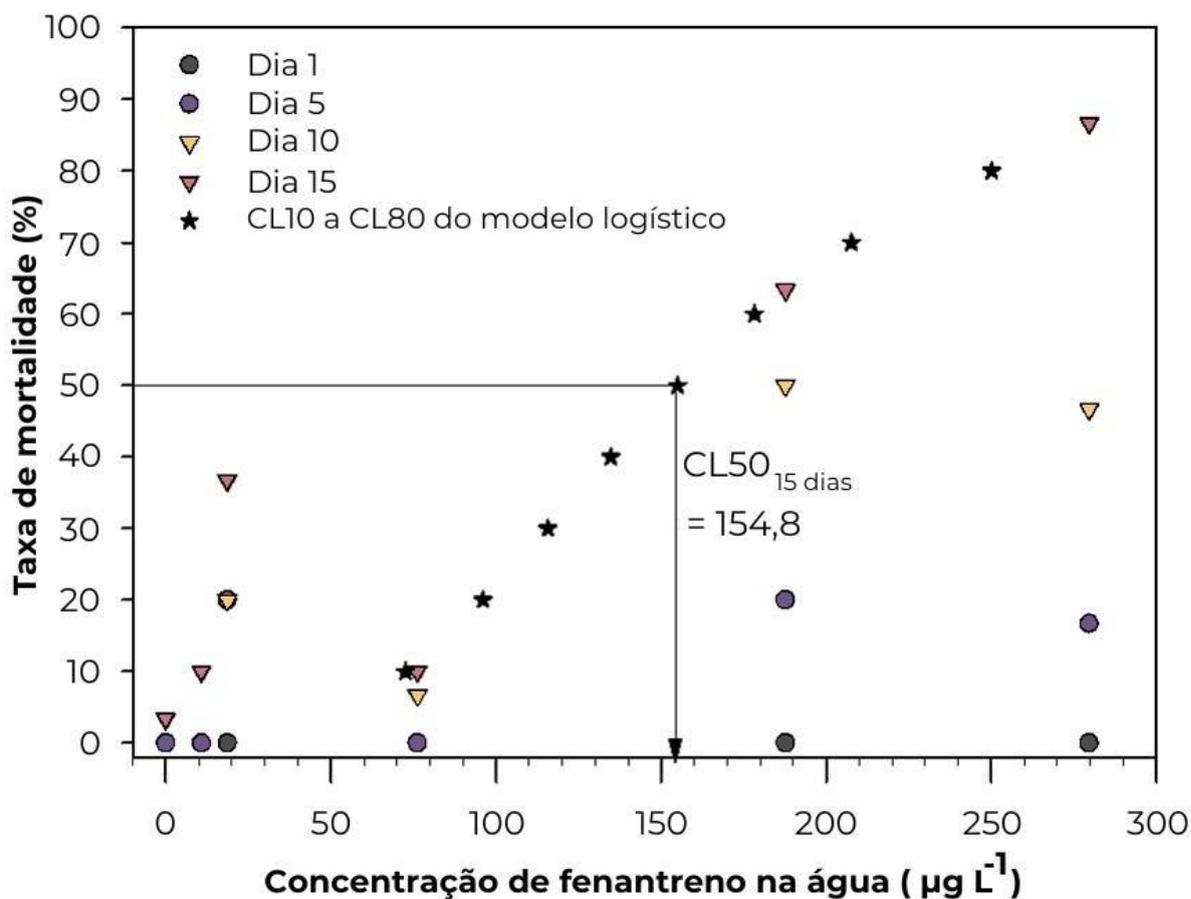


Figura 3. Taxas de mortalidade para girinos do anuro *Dendropsophus branneri* expostos a diferentes concentrações de fenantreno dissolvido na água por 1, 5, 10 e 15 dias, e representação gráfica do ajuste dos dados ao modelo logístico após 15 dias. Não foi verificada diferença nas taxas de mortalidade dos grupos controle e controle-solvente, que não está representado.

5.2 ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DOS GIRINOS EXPOSTOS AOS FENANTRENO

No experimento com exposição de 15 dias, foi verificado atraso no desenvolvimento dos girinos em relação aos controles a partir de 8 dias de exposição, sendo este mais pronunciado dos dias 11 a 15, nas concentrações entre 18,6 e 279,6 µg L⁻¹. A média do estágio Gosner ao final dos 15 dias nos controles atingiram 30,4, em contraste com médias iguais a 28,9, 28,8 e 28,4 para girinos expostos a 76,2, 187,7 e 279,6 µg L⁻¹, respectivamente. O estágio 30 atingido na maioria dos controles se caracteriza pelo final do desenvolvimento do botão que

dá origem as patas traseiras, e este atraso representado por médias entre 28 e 29 são caracterizadas por atraso na formação deste botão. A concentração de efeito observado (CEO) para atraso no desenvolvimento após 15 dias de exposição $CEO_{\text{gosner-15dias}}$ foi igual a $76,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 4). O grau do atraso pode ser caracterizado com base na diferença entre a média Gosner dos controles e a média dos girinos expostos às diferentes concentrações de fenantreno (Delta-gosner = média Gosner controle – média Gosner grupo experimental). Delta-gosner no após 15 dias de exposição foi igual a 1,5, 1,6 e 2,0 para girinos expostos às concentrações 76,2, 187,7 e $279,6 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, caracterizando um progressivo aumento concentração dependente do grau de atraso (Figura 4).

No experimento com exposição de 60 dias, foi verificado atraso no desenvolvimento dos girinos em relação aos controles a partir de 10 dias de exposição nas quatro concentrações testadas, sendo que este atraso aumentou progressivamente com o aumento do tempo de exposição e com o aumento das concentrações de exposição (Figura 5). Ao final dos 60 dias de exposição a média do estágio Gosner dos controles atingiu 42,1, em contraste com médias iguais a 32,0, 30,0, 28,9 e 28,4 para girinos expostos a 10,8, 18,6, 76,2 e $187,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, caracterizando um progressivo aumento concentração dependente do atraso. A concentração de efeito observado (CEO) para atraso no desenvolvimento após 60 dias de exposição $CEO_{\text{gosner-60dias}}$ foi igual a $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 5). O estágio 42 atingido na maioria dos controles após 60 dias se caracteriza pela formação das patas anteriores (posteriores já formadas e com dedos). O atraso verificado nos girinos expostos ao fenantreno por 60 dias, com médias Gosner entre 28 e 32, indica que os mesmos permaneceram na etapa inicial de desenvolvimento das patas traseiras, com valores para delta-gosner iguais a 10,1, 12,1, 13,2 e 13,7 para as concentrações 10,8, 18,6, 76,2 e $187,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

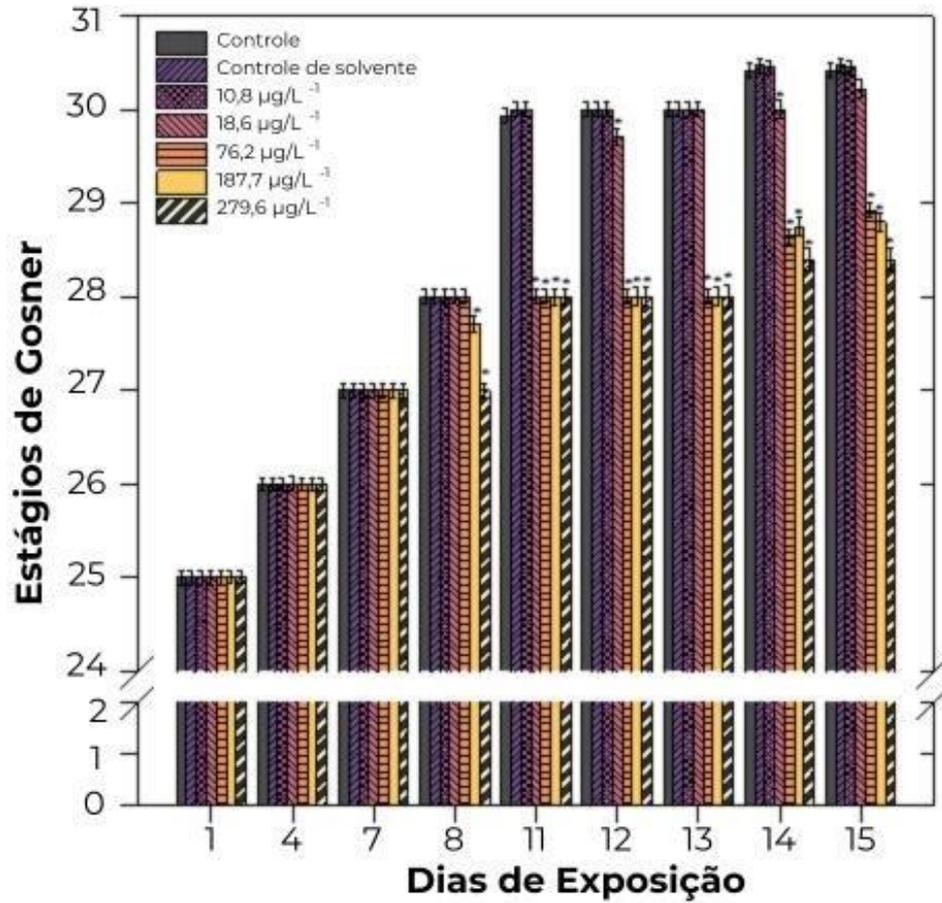


Figura 4. Médias e erro padrão dos estágios de desenvolvimento de girinos da perereca *Dendropsophus branneri* expostas ao fenantreno dissolvido na água por períodos entre 1 a 15 dias. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as médias dos estágios Gosner comparados com a média dos controles no dia respectivo, após ANOVA 2-way seguida do teste de Dunnet, ($p < 0,05$).

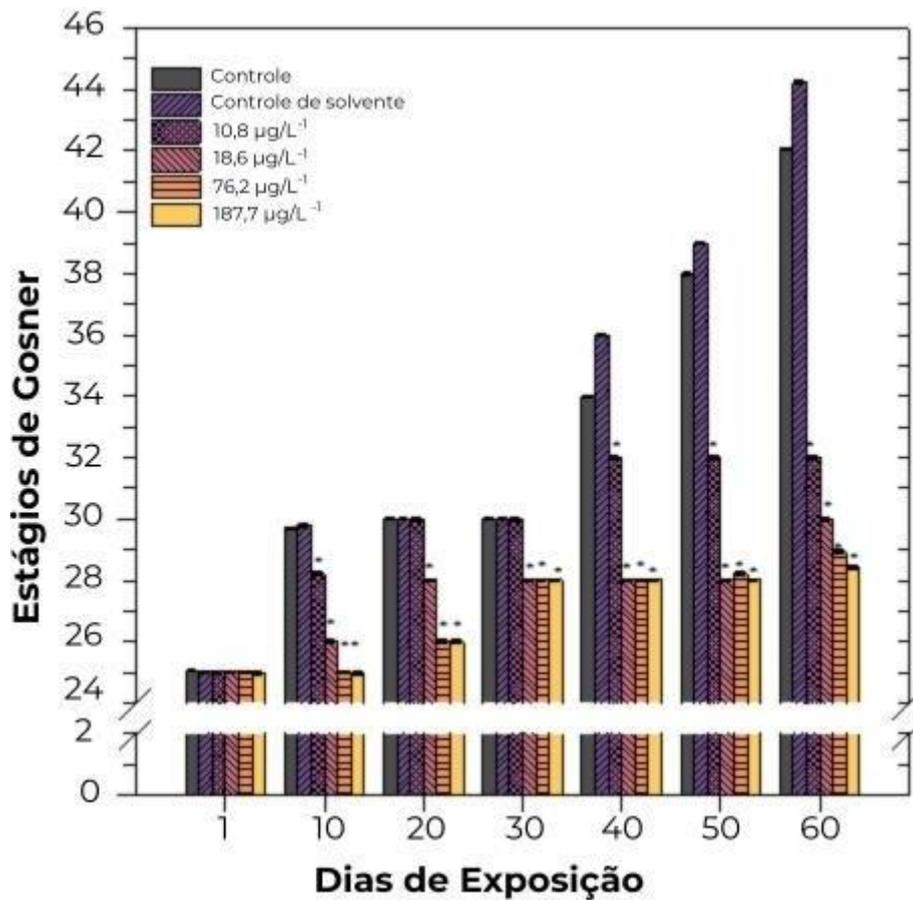


Figura 5. Médias dos estágios de desenvolvimento de girinos da perereca *Dendropsophus branneri* expostas ao fenantreno dissolvido na água por períodos entre 10 a 60 dias. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as médias dos estágios Gosner comparados com a média do controle no dia respectivo, após ANOVA 2-way seguida do teste de Dunnet, ($p < 0,05$).

5.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM PESO E EM COMPRIMENTO

As concentrações de efeito observado (CEO) para peso úmido e comprimento total foram iguais a 10,8 e 279,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O peso úmido dos girinos expostos aos grupos experimentais durante o primeiro experimento 18,6, 76,2, 187,7 e 279,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi significativamente menor que o dos girinos nos grupos controle (Kruskall-Wallis $H_{(6)} = 36.5$, $p < 0.001$ seguido de Dunn, $p < 0,05$) (Figura 6A). Para o segundo experimento durante 60 dias o peso úmido (ANOVA $_{(5,81)} = 7,67$, seguido de Dunn, $p < 0,05$). Em relação ao comprimento total, apenas os girinos expostos aos grupos experimentais com concentração de 279,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram significativamente menores que os girinos do grupo controle após 15 dias de exposição (ANOVA $F_{(6,55)} = 5,04$, seguido de Dunnet, $p < 0,05$) (Figura 6B).

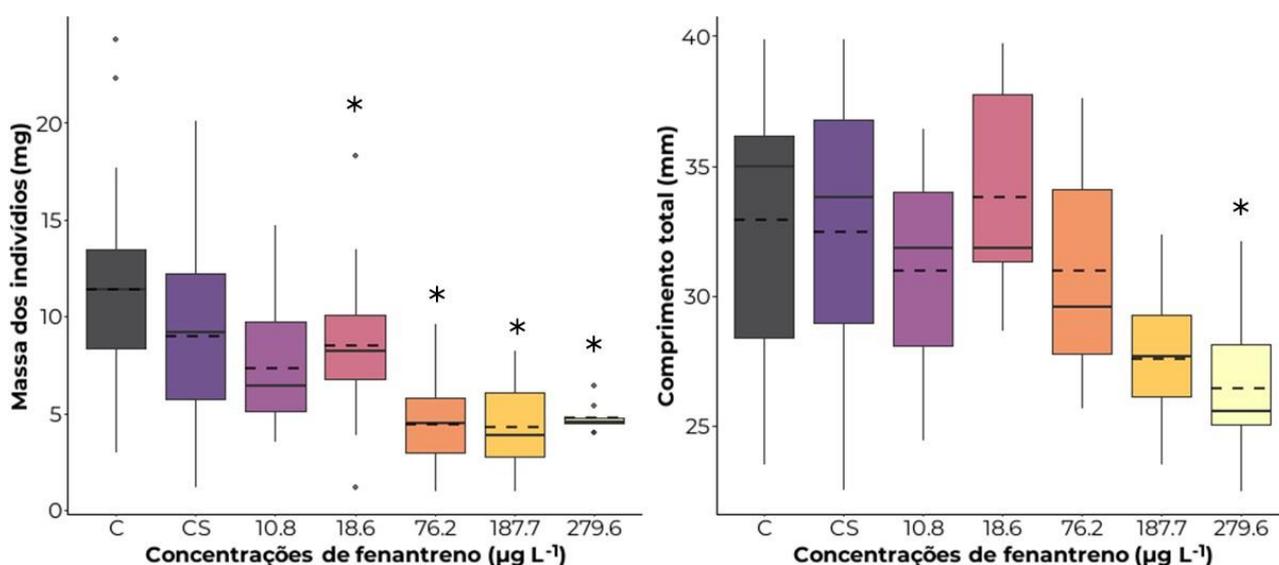


Figura 6. Peso úmido e comprimento total de girinos de *Dendropsophus branneri* expostos a diferentes concentrações de fenantreno por 15 dias. Média representada por linhas pontilhadas e mediana e quartis por linhas contínuas. Os pontos pequenos representam os outliers. Asteriscos indicam grupos experimentais com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (C). CS: controle de solvente.

5.4 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

A atividade das enzimas GST, AChE e CAT aumentou nos girinos expostos ao fenantreno, e as concentrações de efeito observado (CEO) para GST, AChE e CAT foram iguais a 76,2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A atividade da GST foi induzida 3,3 e 8,4 x em comparação aos controles nas concentrações 76,2 e 187,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Kruskall-Wallis $H_{(6)} = 31,5$ $p < 0.001$ seguido de Dunn, $p < 0,05$) (Figura 7A). A atividade da AChE foi induzida 2,9 e 7,3 x em comparação aos controles nas concentrações 76,2 e 187,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Kruskall-Wallis $H_{(6)} = 21,1$ $p < 0.001$ seguido de Dunn, $p < 0,05$) (Figura 7B). A atividade da CAT foi induzida 3,8 e 7,1 x em comparação aos controles nas concentrações 76,2 e 187,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Kruskall-Wallis $H_{(5)} = 21,3$ $p < 0.001$ seguido de Dunn, $p < 0,05$) (Figura 7C).

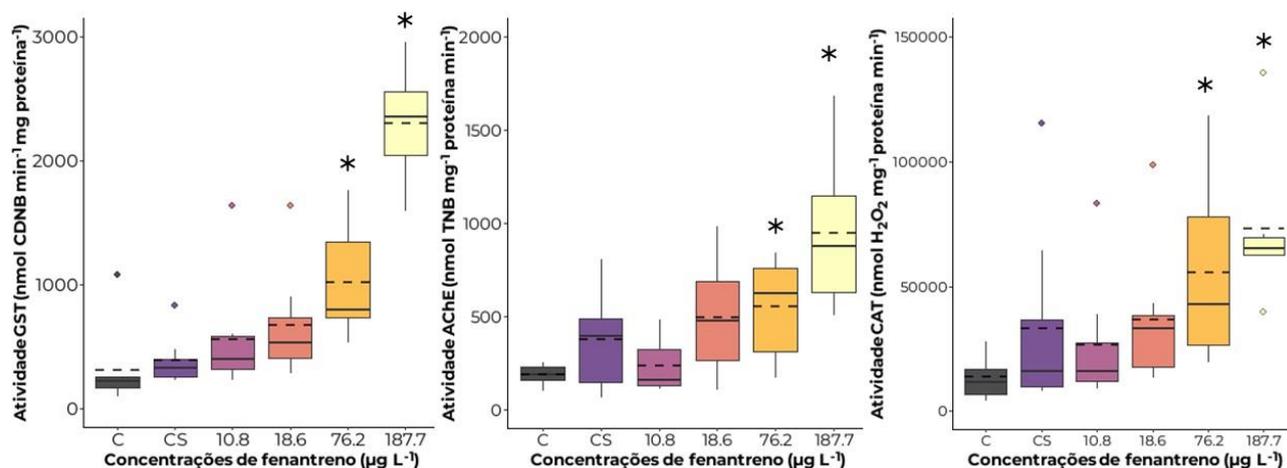


Figura 7. Atividade enzimática da glutationa S-transferase (GST), Acetilcolinesterase (AChE) e Catalase (CAT) em girinos de *Dendropsophus branneri* expostos ao fenantreno por 15 dias. (A) GST; (B) AChE (C) CAT. Média representada por linhas pontilhadas e mediana e quartis por linhas contínuas. Os pontos pequenos em formato de losango representam os outliers. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (C). CS: controle de solvente.

5.6 COMPORTAMENTO NATATÓRIO

A velocidade média de natação dos girinos não diferiu em função das diferentes concentrações de fenantreno (Kruskall-Wallis $H_{(5)} = 10,1$ $p = 0.07$) (Figura 8).

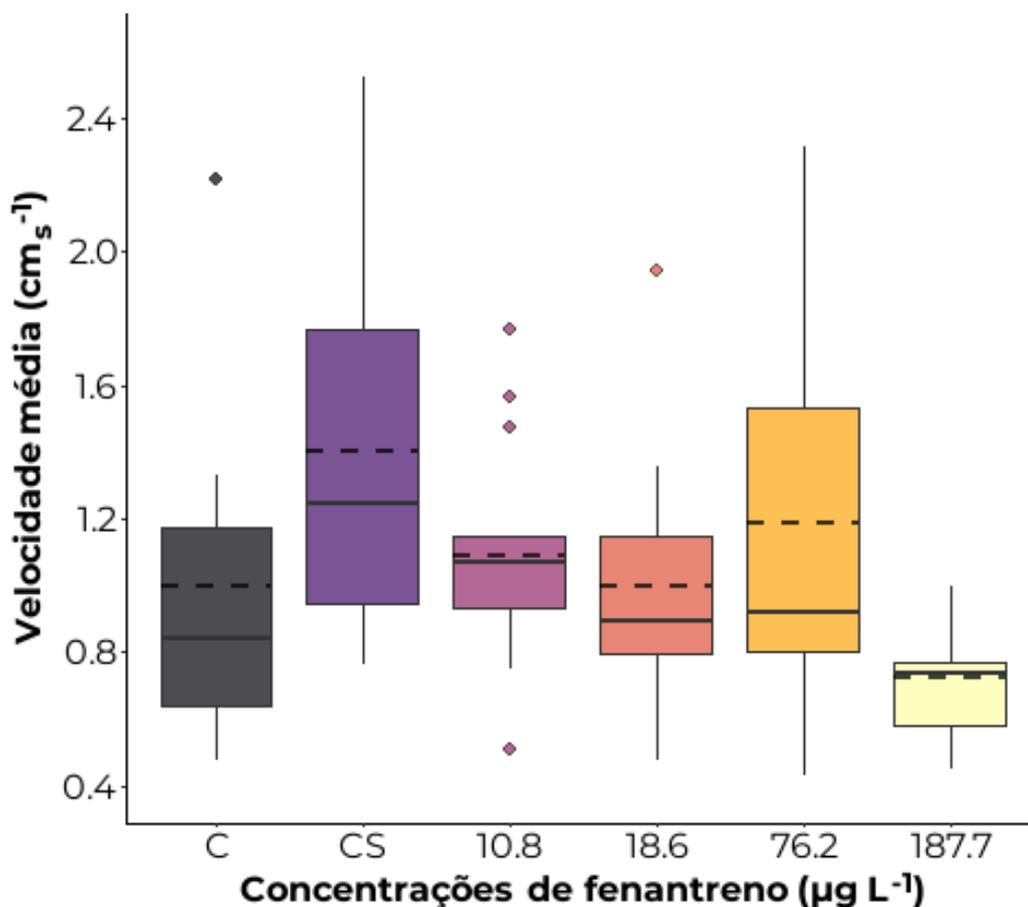


Figura 8. Velocidade média de natação espontânea de girinos da perereca *Dendropsophus branneri* expostas ao fenantreno dissolvido na água por 12 dias. Média representada por linhas pontilhadas e mediana e quartis por linhas contínuas. Os pontos pequenos em formato de losango representam os outliers.

A análise das trajetórias de natação dos girinos sugere uma perda da tigmotaxia (natação rente as bordas da arena experimental) em girinos expostos ao fenantreno a partir da concentração 10,8 µg L⁻¹ (Figura 8).

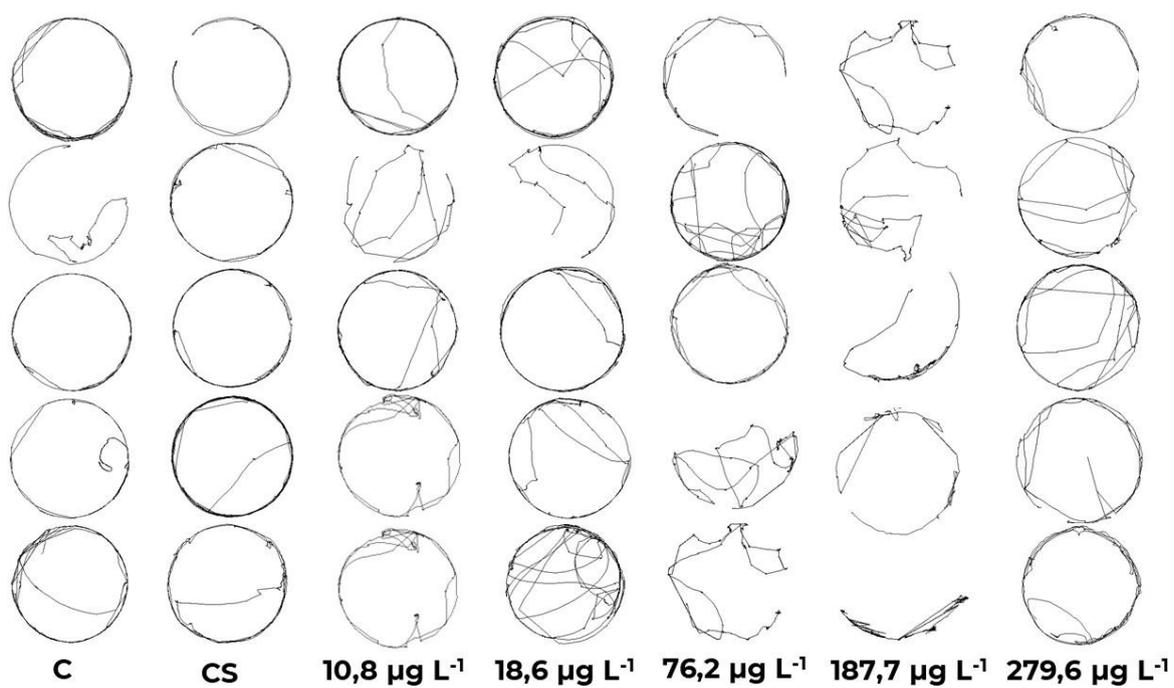


Figura 9. Mapas de trajetória dos girinos expostos ao fenantreno dissolvido na água por 12 dias em *Dendropsophus branneri*. C: Controle; CS: controle de solvente.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram verificados efeitos letais e subletais para a fase embriolarval da perereca *Dendropsophus branneri* exposta por 15 e 60 dias ao fenantreno, quantificados pela $CL_{50_{15\text{dias}}}$ e por concentrações de efeito observado para atrasos no desenvolvimento larval, diminuição do peso úmido final, diminuição do comprimento final e indução das enzimas glutationa S-transferase, catalase e acetilcolinesterase iguais a 154, 10,8, 10,8, 279,6, 76,2, 76,2, 76,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A $CL_{50-96\text{h}}$ do fenantreno para girinos da rã aquática sul-africana *Xenopus laevis* e da rã-verde *Pelophylax perezi* expostas a partir do estágio Gosner 25 foi estimada em 7,6 mg L^{-1} e 12,4 mg L^{-1} , respectivamente (Rusković, 2021b). Para girinos expostos a partir do estágio Gosner 25 de *Euphlyctis cyanophlyctis*, e *Polypedates maculatus* a $CL_{50-96\text{h}}$ do fenantreno foi estimada em 12,28 e 3,23 mg L^{-1} , respectivamente (Bhuyan and Giri, 2020; Bhuyan et al., 2020c). Entretanto, é importante ressaltar que a solubilidade do fenantreno em água doce é igual a 1,1 mg L^{-1} (Latimer and Zheng, 2003), sendo 7 a 12 x menor que as CL_{50} relatadas nestes estudos. Isso levanta questionamentos sobre a real concentração de fenantreno dissolvido durante as exposições realizadas. Sem levar em conta o tempo de exposição, a $CL_{50_{15\text{dias}}}$ para *Dendropsophus branneri* neste estudo, igual a 154 $\mu\text{g L}^{-1}$ é aproximadamente 21x menor que a $CL_{50-96\text{h}}$ de *P. maculatus* (Bhuyan and Giri, 2020), indicando uma sensibilidade significativamente maior de *D. branneri*. Com isso, provavelmente esses valores não são diretamente comparáveis, pois as concentrações utilizadas e relatadas nos estudos acima são muito superiores ao limite de solubilidade do fenantreno. A $CL_{50-96\text{h}}$ do fenantreno para *Rana limnocharis* foi igual a de 631 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Wu et al., 2015b), sendo que este experimento foi realizado dentro da faixa de concentrações que não excedem a solubilidade máxima do fenantreno. Os indivíduos expostos de *R. limnocharis* tinham comprimento e peso de 1,6 cm e 0,2 g, respectivamente, e não foi relatado o estágio de desenvolvimento (Patar et al., 2021). No caso de *R. limnocharis* a duração da exposição difere significativamente deste estudo, em que não foi possível fazer estimativa da CL_{50} ao final de 96h decorridas do início da exposição, uma vez que as taxas de mortalidade não ultrapassaram 20% após 120h de exposição mesmo na maior concentração testada de 279 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3). Desta forma, é possível somente prever que a $CL_{50_{120\text{h}}}$ para *Dendropsophus branneri* neste estudo é superior a 279 $\mu\text{g L}^{-1}$. A sensibilidade de 18 diferentes espécies aquáticas ao fenantreno com base na $CL_{50_{96\text{h}}}$ oscila entre 27 e 3.600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o crustáceo misidáceo *Americamysis bahia* (mais sensível) e para o peixe *Misgurnus anguillicaudatus* (mais resistente), respectivamente segundo (Wu et al., 2015b),

entre os estágios 25 e 30 de *Dendropsophus branneri* neste estudo torna relativamente mais sensível ao fenantreno, dentre as espécies já testadas no estudo com base na toxicidade letal.

Significativos atrasos no desenvolvimento de *Dendropsophus branneri* foram verificados neste estudo, tanto numa exposição de 15 dias, com $CEO_{\text{gosner-15dias}} = 76,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 4) quanto de 60 dias, com $CEO_{\text{gosner-60dias}} = 10,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 5). Na exposição de 15 dias o atraso representado por Delta-gosner não ultrapassou 2 estágios de atraso, enquanto na exposição de 60 dias o atraso foi significativamente maior, com valores Delta-gosner entre 10 e 13, incluindo a menor concentração de exposição de $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Ao final de 60 dias, os girinos de *D. branneri* expostos permaneceram na etapa inicial de desenvolvimento das patas traseiras (Gosner 28-32), em contraste com controles que atingiram o estágio 42, com patas anteriores e posteriores já formadas e com dedos, próximos da metamorfose. Girinos da rã européia *Pelophylax lessonae* (anteriormente *Rana ridibunda*) foram expostos a fração solúvel em água de petróleo bruto a partir do estágio Gosner 25 por 60 dias, o que resultou no atraso do desenvolvimento em 3 a 4 estágios de Gosner nas maiores concentrações de exposição (Sutuyeva et al., 2019). A presença de significativas concentrações de HPAs, inclusive fenantreno, em frações solúveis em água de petróleo bruto é amplamente documentada (Li et al., 2019; Perrichon et al., 2016), mas neste estudo de (Sutuyeva et al., 2019) não foi quantificada a concentração dos 16 HPAs prioritários que inclui o fenantreno, sendo razoável supor que esta molécula estivesse presente nesta mistura, ainda que em concentração desconhecida. Curiosamente, apesar da exposição ter durado o mesmo período de 60 dias, o valor de Delta-gosner entre 3 e 4 para *P. lessonae* (Sutuyeva et al., 2019) foi significativamente menor que o verificado neste estudo com fenantreno puro isolado, entre 10 e 13. No presente estudo as concentrações utilizadas de fenantreno (10 a $187 \mu\text{g L}^{-1}$) são altas e tipicamente não são encontradas em misturas de HPAs como as frações solúveis em água de petróleo (Li et al., 2019; Perrichon et al., 2016), isso sugere que o fenantreno, sozinho, pode ter um papel significativo no atraso do desenvolvimento larval em anfíbios.

Além disso, misturas de HPAs podem afetar o desenvolvimento de *Xenopus tropicalis* e *Rana pipiens* (Melvin and Trudeau, 2012) além de fração de óleo solúvel atrasar o desenvolvimento de *Xenopus laevis* (Bryer et al., 2006). Esses resultados foram evidenciados após observações do hormônio tireoidiano (TH) que é responsável por mediar várias mudanças morfológicas no desenvolvimento inicial de vertebrados, inclusive os anuros, em que a estimulação do TH inicia as transições do estágio larval para o juvenil (Dodd and Dodd, 1976). O sistema endócrino é responsável por desempenhar um papel importante na regulação de vários processos biológicos principalmente crescimento e desenvolvimento. Os compostos

originados do petróleo bruto podem demonstrar modular os sistemas endócrinos de vertebrados (Truter et al., 2017). Assim, alguns estudos, como os citados acima afirmam que os componentes solúveis em água derivados do petróleo podem afetar adversamente a expressão do gene sensível ao hormônio TH, resultando numa diminuição significativa (Thambirajah et al., 2019).

O atraso no desenvolvimento dos membros posteriores e anteriores implica na extensão do tempo necessário à metamorfose e à aquisição da capacidade de abandonar o ambiente aquático. Tem um potencial impacto sobre a dispersão de juvenis, especialmente em regiões tropicais, onde ambientes aquáticos temporários podem secar rapidamente em épocas com maior escassez de chuvas (Sparling et al., 2010a).

O atraso no desenvolvimento também esteve associado a um decréscimo do peso úmido final dos girinos de *Dendropsophus branneri* neste estudo, com uma $CEO_{\text{peso-úmido-15dias}}$ igual a $18,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Decréscimo no peso final de girinos de diferentes espécies expostos ao fenantreno (Bhuyan and Giri, 2020; Rusković, 2021b), ou a fração solúvel de petróleo (Mahaney, 1994; Sutuyeva et al., 2019) tem sido relatadas. Medidas morfométricas como o peso, comprimento do corpo ou condições corporais podem estar correlacionadas com aptidão, o que a diminuição dessas medidas podem implicar diretamente na sua sobrevivência, reprodução ou até tamanho dos ovos em fêmeas (Gupta, 2009; Venturino et al., 2003). E, nominalmente a sensibilidade de *D. branneri* é significativamente maior com base na CEO deste estudo de $18,6 \mu\text{g L}^{-1}$ em contraste com CEOs na ordem de 2,7 a 6mg L^{-1} (Rusković, 2021b) e $646 \mu\text{g L}^{-1}$ (Bhuyan and Giri, 2020). Entretanto, é importante salientar a questão já comentada sobre o uso de concentrações de exposição bem acima da solubilidade do fenantreno nestes estudos.

As CEO para indução da GST e CAT foram iguais a $76,2 \mu\text{g L}^{-1}$, ambas induzidas entre 3 e 7x relativo aos controles. A exposição de girinos de *Euphlyctis cyanophlyctis* ao fenantreno nas concentrações de 0,6 e $1,2 \text{mg L}^{-1}$ induziu significativamente a peroxidação lipídica e a atividade da superóxido dismutase (SOD) (Bhuyan et al., 2020c), sendo que SOD e CAT são componentes importantes da primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (ERO) (Jiang et al., 2022). A exposição do peixe *Carassius auratus* a fenantreno na água entre 10 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ induziu um aumento de ERO associado a um aumento da atividade da SOD, CAT e GST (Yin et al., 2007). Apesar de não termos quantificado ERO neste estudo, é razoável especular que a exposição de *D. branneri* a fenantreno entre 76 e $187 \mu\text{g L}^{-1}$ tenha induzido ERO, o que explicaria a verificada indução significativa de GST e CAT, que estariam sendo induzidas de forma a tentar contrapor o estresse oxidativo causado pela exposição ao fenantreno.

A CEO para indução da AChE em *D. branneri* neste estudo foi igual a 76,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, induzida entre 3 e 7x relativo aos controles, contrariando evidências de que fenantreno inibe a AChE no peixe *Paralichthys olivaceus* (Jee and Kang, 2003) nos bivalves *Mytilus galloprovincialis* e *Ruditapes decussatus* (Dellali et al., 2023), no anfípoda *Hyalella azteca* (Gauthier et al., 2016) e no verme *Eisenia fetida* (He and Liu, 2023). A exposição de girinos da rã indiana *Fejervarya limnocharis* ao HPA fluoranteno na concentração 5,5 e 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ inibiu a atividade da AChE (Krishna et al., 2020). Os potenciais efeitos da exposição a HPAs na atividade da AChE são variados, com evidências tanto de indução quanto inibição da AChE, e os mecanismos associados a estas alterações são desconhecidos. (Fu et al., 2018; Olivares-Rubio et al., 2021). Desta forma, são necessários mais estudos para compreender os efeitos da exposição ao fenantreno e outros HPAs na AChE em anfíbios.

A análise da trajetória de natação de girinos de *D. branneri* expostos ao fenantreno considerando as imagens e indivíduos sugere uma perda da tigmotaxia (natação próxima às paredes da arena experimental), de modo semelhante ao verificado em girinos de *Rana temporaria* expostos ao inseticida endosulfan (Denoël et al., 2013). Esta perda da tigmotaxia, relacionada à procura tátil de estruturas para se esconder de predadores pode ser interpretada como uma possível perda de comportamentos antipredatórios, que teriam consequências negativas para a sobrevivência em ambientes naturais.

Tendo em vista que o fenantreno pode causar tanto efeitos letais em curto prazo de exposição, quanto efeitos subletais em exposições mais longas, podem ser estabelecidos os critérios de qualidade de água denominados “criterion maximum concentration” (CMC), que define a máxima concentração baseada numa média de amostras coletadas durante uma hora que não deve resultar em efeitos tóxicos inaceitáveis aos organismos aquáticos após exposições curtas, e o “criterion continuous concentration” (CCC), que define a máxima concentração baseada numa média de uma amostras coletadas durante quatro dias que não deve resultar em efeitos tóxicos inaceitáveis aos organismos aquáticos após exposição de longa duração (USEPA, 2010). Desta forma, CMC é uma concentração maior que deve prevenir efeitos de exposição curta duração (agudos) enquanto CCC é uma concentração menor que deve prevenir efeitos de exposição de longa duração (crônicos). A CMC e a CCC para o fenantreno em ambientes aquáticos de água doce foi estabelecida em 51 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 18,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Wu et al., 2015b). Desta forma, com base nestes critérios de qualidade de água para fenantreno, as fases iniciais de *Dendropsophus branneri* não estariam protegidas por este CCC igual a 18,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, com base nos relevantes e significativos atrasos no desenvolvimento detectados a partir da concentração de 10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$.

7. CONCLUSÕES

A sensibilidade da fase inicial de *D. branneri* à exposição ao fenantreno baseada em efeitos tóxicos letais é maior que a relatada para outras espécies de anuros, e a enquadra entre as espécies aquáticas mais sensíveis. O significativo atraso no desenvolvimento larval de *D. branneri* verificado após exposição a concentrações de fenantreno dissolvido na água a partir de $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$ indica que a espécie é suscetível a efeitos ecologicamente relevantes em concentrações que podem ser verificadas em ambientes contaminados por fenantreno. Critérios de qualidade de água para fenantreno estabelecidos na literatura e os órgãos ambientais podem não ser suficientes para proteger a fase inicial de vida de *D. branneri*. A exposição da fase larval de *D. branneri* ao fenantreno influencia negativamente seu desenvolvimento inicial e sobrevivência, podendo afetar o recrutamento da espécie para a fase adulta.

AGRADECIMENTOS

Todos os procedimentos de coleta e abordagens experimentais foram realizados de acordo com autorização emitida pelo Sisbio/ICMBio (licença n° 84573⁻¹) e parecer emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE (n° 141/2022). NVNSM recebeu uma bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-processo # 88887.702879/2022-00) durante a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

Referências

Abdel-Shafy et al., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian journal of petroleum* 25, 107-123.

Abercrombie, S.A., de Perre, C., Choi, Y.J., Tornabene, B.J., Sepúlveda, M.S., Lee, L.S., Hoverman, J.T., 2019. Larval amphibians rapidly bioaccumulate poly- and perfluoroalkyl substances. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 178, 137-145.

Afonso, M., Coelho, L., Jesus, F., Campos, I., Abrantes, N., Gonçalves, F.J., Marques, S., Serpa, D., 2022. Effects of Pine and Eucalypt ashes on bacterial isolates from the skin microbiome of the fire salamander (*Salamandra salamandra*). *Science of The Total Environment* 841, 156677.

Alford et al., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual review of Ecology and Systematics* 30, 133-165.

Allan, S.E., Smith, B.W., Anderson, K.A., 2012. Impact of the Deepwater Horizon oil spill on bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Mexico coastal waters. *Environmental science & technology* 46, 2033-2039.

Alvarez, D.A.J.F.E., 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. 16, 640-648.

Alves, R.N., Mariz Jr, C.F., de Paulo, D.V., Carvalho, P.S.J.C., 2017. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. 178, 224-230.

Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 87-110.

Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., 2015. *Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks*. Academic press.

Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Rainbow, P.S., 2012. *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. CRC press.

Armitage, J.M., Toose, L., Camenzuli, L., Redman, A.D., Parkerton, T.F., Saunders, D., Wheeler, J., Martin, A., Vaiopoulou, E., Arnot, J.A., 2021. A critical review and weight of evidence approach for assessing the bioaccumulation of phenanthrene in aquatic environments. *Integrated Environmental Assessment and Management* 17, 911-925.

Baracho, É.B.d.O., 2015. História natural e repertório acústico de *dendropsophus branneri* (cochran, 1948)(anura, hylidae) no Nordeste brasileiro. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Bhuyan, K., Giri, A., 2020. Phenanthrene Toxicity in Tadpoles of *Polypedates maculatus* (Anura, Dicroglossidae) with Special Reference to Growth, Life History and Genotoxicity. *Indian Journal Of Natural Sciences* 10, 18498-18185.

Bhuyan, K., Patar, A., Singha, U., Giri, S., Giri, A., 2020a. Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, Dicroglossidae) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 20962-20971.

Bhuyan, K., Patar, A., Singha, U., Giri, S., Giri, A., 2020b. Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, Dicroglossidae) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay. *Environmental Science and Pollution Research*.

Bhuyan, K., Patar, A., Singha, U., Giri, S., Giri, A., 2020c. Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, Dicroglossidae) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 20962-20971.

Boiarski, D.R., Toigo, C.M., Sobjak, T.M., Santos, A.F.P., Romão, S., Guimarães, A.T.B., 2020. Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to water from an urban stream. *Ecotoxicology* 29, 314-326.

Boualil, L., Cayuela, H., Ballu, A., Cattin, L., Reis, C., Chèvre, N., 2023. The Amphibian Short-Term Assay: Evaluation of a New Ecotoxicological Method for Amphibians Using Two Organophosphate Pesticides Commonly Found in Nature—Assessment of Behavioral Traits. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42, 1595-1606.

Bradford, M.M.J.A.b., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 72, 248-254.

Bridges, C., 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of environmental contamination and toxicology* 39, 91-96.

Bryer, P.J., Elliott, J.N., Willingham, E.J., 2006. The effects of coal tar based pavement sealer on amphibian development and metamorphosis. *Ecotoxicology* 15, 241-247.

Castro, I.M., Reboucas, R., Sole, M.J.N.-W.J.o.Z., 2016. Diet of *Dendropsophus branneri* (Cochran, 1948)(Anura: Hylidae) from a cocoa plantation in southern Bahia, Brazil. 12, 159-165.

Cerniglia, C.E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology* 4, 331-338.

Chen, Y., Zhang, Y., Yu, Z., Guan, Y., Chen, R., Wang, C., 2021. Early-life phenanthrene exposure inhibits reproductive ability in adult zebrafish and the mechanism of action. *Chemosphere* 272, 129635.

Clulow, J., Trudeau, V.L., Kouba, A.J., 2014. Amphibian declines in the twenty-first century: why we need assisted reproductive technologies. *Reproductive sciences in animal conservation: progress and prospects*, 275-316.

Cochran, D.M., 1948. A new subspecies of tree frog from Pernambuco, Brazil. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 38, 316-318.

Coltro, M.d.L., da Silva, P.R., Valgas, A.A.N., Miguel, C., de Freitas, B.S., Oliveira, G.T.J.W., Air, Pollution, S., 2017. Influence of the herbicide facet® on corticosterone levels, plasma metabolites, and antioxidant system in the liver and muscle of American bullfrog tadpoles. 228.

Costa, R.N., Franco, F., Solé, M., de Cerqueira Rossa-Feres, D., Nomura, F., 2024a. How Pollutants are Affecting Amphibian Tadpoles: Relationship with Anthropogenic Pollutants and Perspectives for the Future. *Toxicology of Amphibian Tadpoles 1st Edition*, 1-26.

Costa, R.N., Franco, F., Solé, M., de Cerqueira Rossa-Feres, D., Nomura, F., 2024b. How pollutants are affecting amphibian tadpoles: relationship with anthropogenic pollutants and perspectives for the future. *Toxicology of Amphibian Tadpoles*, 1-26.

Cuzziol Boccioni, A.P., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Martinuzzi, C.S.J.C., 2021. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. 273.

da Costa Araújo, A.P., de Melo, N.F.S., de Oliveira Junior, A.G., Rodrigues, F.P., Fernandes, T., de Andrade Vieira, J.E., Rocha, T.L., Malafaia, G., 2020a. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *Journal of hazardous materials* 382, 121066.

da Costa Araújo, A.P., Gomes, A.R., Malafaia, G., 2020b. Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical *physalaemus cuvieri* tadpoles (Fitzinger, 1826). *Journal of hazardous materials* 386, 121992.

da Luz, T.M., da Costa Araújo, A.P., Estrela, F.N., Braz, H.L.B., Jorge, R.J.B., Charlie-Silva, I., Malafaia, G.J.S.o.t.T.E., 2021. Can use of hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19 affect aquatic wildlife? A study conducted with neotropical tadpole. 780, 146553.

De Abreu, R.O., Junca, F.A., Souza, I.C.A., Napoli, M.F.J.Z., 2015. The tadpole of *Dendropsophus branneri* (Cochran, 1948)(Amphibia, Anura, Hylidae). *Zootaxa* 3946, 296-300.

Dellali, M., Mardassi, K., Harrath, A.H., Mansour, L., Pacioglu, O., Aldahmash, W., Nahdi, S., Badraoui, R., Alrefaei, A.F., Boufahja, F., 2023. Physiological Responses of the Bivalves *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus* Following Exposure to Phenanthrene: Toxicokinetics, Dynamics and Biomarkers Study. *Animals* 13.

Denoël, M., Libon, S., Kestemont, P., Brasseur, C., Focant, J.-F., De Pauw, E., 2013. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: A video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere* 90, 945-951.

Depledge, M., Aagaard, A., Györkös, P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31, 19-27.

Di Giulio, R.T., Meyer, J.N., 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. The toxicology of fishes, 273-324.

Dodd, M., Dodd, J., 1976. The biology of metamorphosis. *Physiology of the Amphibia* 3, 467-599.

Domenici, P., Claireaux, G., McKenzie, D., 2007. Environmental constraints upon locomotion and predator-prey interactions in aquatic organisms: an introduction. *The Royal Society London*, pp. 1929-1936.

Dong, W.-j., Yang, X.-w., Yang, X.-m., Long, X.-z., Han, X.-y., Cui, L.-y., Tong, Q., 2024. Rice straw ash and amphibian health: A deep dive into microbiota changes and potential ecological consequences. *Science of The Total Environment* 926, 171651.

Douben, P.E., 2003. PAHs: An Ecotoxicological Perspective. Wiley Online Library

Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J.B.r., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81, 163-182.

England, E., Morris, J., Bussy, C., Hancox, J.C., Shiels, H., 2024. The Key Characteristics of Cardiotoxicity for the Pervasive Pollutant Phenanthrene. *Journal of Hazardous Materials*, 133853.

Faivovich, J., Haddad, C.F., Garcia, P.C., Frost, D.R., Campbell, J.A., Wheeler, W.C.J.B.o.t.A.M.o.n.H., 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. 2005, 1-240.

Fernandes, I.F., 2020. Biomarcadores bioquímicos em fígado de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, como indicadores biológicos de contaminação aquática.

Fernandes, I.F., Utsunomiya, H.S.M., de Lacerda Valverde, B.S., Ferraz, J.V.C., Fujiwara, G.H., Gutierrez, D.M., de Oliveira, C., Belussi, L.F., Fernandes, M.N., dos Santos Carvalho, C., 2021. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (). *Chemosphere* 275, 130000.

Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H.Q., Zhao, B., 2018. Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants. *Environmental Science and Technology* 52, 8065-8074.

Gauthier, P.T., Norwood, W.P., Prepas, E.E., Pyle, G.G., 2016. Behavioural alterations from exposure to Cu, phenanthrene, and Cu-phenanthrene mixtures: Linking behaviour to acute toxic mechanisms in the aquatic amphipod, *Hyalella azteca*. *Aquatic Toxicology* 170, 377-383.

Gomez-Mestre, 2003. Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments. 57, 1889-1899.

Gomez-Mestre, I., Saccoccio, V.L., Iijima, T., Collins, E., Rosenthal, G.G., Warkentin, K.M.J.J.o.E.B., 2010. The shape of things to come: linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. 23, 1364-1373.

Gosner, K.L.J.H., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. 16, 183-190.

Grillitsch et al., 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of measurement parameters under toxicant-induced stress. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 18, 2743-2750.

Gupta, N., 2009. Effects of oil sands process-affected water and substrates on wood frog (*Rana sylvatica*) eggs and tadpoles. University of Saskatchewan.

Haddad et al., 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. 55, 207-217.

Häder, D.-P., Banaszak, A.T., Villafaña, V.E., Narvarte, M.A., González, R.A., Helbling, E.W., 2020. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of the Total environment* 713, 136586.

Hayden, M.T., Reeves, M.K., Holyoak, M., Perdue, M., King, A.L., Tobin, S.C.J.E., 2015. Thrice as easy to catch! Copper and temperature modulate predator-prey interactions in larval dragonflies and anurans. 6, 1-17.

Hayes, T., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M., 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology* 213, 921-933.

He, F., Liu, R., 2023. Mechanistic insights into phenanthrene-triggered oxidative stress-associated neurotoxicity, genotoxicity, and behavioral disturbances toward the brandling worm (*Eisenia fetida*) brain: The need for an ecotoxicological evaluation. *Journal of Hazardous Materials* 450, 131072.

Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 2003. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos, Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations. ASTM International.

Hopkins, W.A., 2007. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR journal* 48, 270-277.

Howe, G.E., Gillis, R., Mowbray, R.C., 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 17, 519-525.

Ibrahimi, E., Miri, F., Porreca, A., Aliko, V.J.A.a.S., 2023. Mixed modeling of the effect of pharmaceutical pollution on the metamorphosis of amphibians from incomplete trajectory data.

Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L.J.E.h.p., 2005. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. 113, 1755-1762.

Jee, J.-H., Kang, J.-C., 2003. Effects of Phenanthrene Exposure on the Acetylcholinesterase Activity of Olive Flounder (*Paralichthys Olivaceus*). *Fisheries and Aquatic Sciences* 6, 225–227.

Jiang, L., Pan, Y., Zhu, S., Qiu, J., Shang, Y., Xu, J., Li, F., Wang, H., 2022. Stimulatory and inhibitory effects of phenanthrene on physiological performance of *Chlorella vulgaris* and *Skeletonema costatum*. *Scientific Reports* 12, 5194.

Jones-Costa, M., Franco-Belussi, L., Vidal, F.A.P., Gongora, N.P., Castanho, L.M., dos Santos Carvalho, C., Silva-Zacarin, E.C.M., Abdalla, F.C., Duarte, I.C.S., De Oliveira, C.J.E., safety, e., 2018. Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Ecotoxicology and environmental safety* 151, 184-190.

Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.J.E.i., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international* 60, 71-80.

Kloh, J.S., 2022. Tadpole Dance: estratégias alimentares em girinos. *Dissertação de Mestrado - UFMG*.

Krishna et al., 2020. Changes in behavior, cardiac rate and acetylcholinesterase activity in tadpoles of *Fejervarya limnocharis* (Anura, Dicroglossidae) in response to sub-lethal exposure to fluoranthene. 15, 8.

Latimer, J.S., Zheng, J., 2003. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33.

Leite, P.Z., Margarido, T.C.S., de Lima, D., Rossa-Feres, D.d.C., de Almeida, E.A., 2010. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 1411-1421.

Li, X., Xiong, D., Ding, G., Fan, Y., Ma, X., Wang, C., Xiong, Y., Jiang, X., 2019. Exposure to water-accommodated fractions of two different crude oils alters morphology, cardiac function and swim bladder development in early-life stages of zebrafish. *Chemosphere* 235, 423-433.

Linder, G., Lehman, C.M., Bidwell, J.R., 2010. Ecotoxicology of amphibians and reptiles in a nutshell, *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. CRC Press, pp. 95-130.

Linke, S., & Hermoso, V., 2022. Biodiversity conservation of aquatic ecosystems. *Encyclopedia of Energy Storage*.

Little et al., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 380-385.

Lutz, B., 1973. *Brazilian Species of Hyla*. Univ. Texas Press, Austin, London.

Mahaney, P.A., 1994. Effects of freshwater petroleum contamination on amphibian hatching and metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 259-265.

Melvin, S.D., Trudeau, V.L., 2012. Growth, development and incidence of deformities in amphibian larvae exposed as embryos to naphthenic acid concentrations detected in the Canadian oil sands region. *Environmental Pollution* 167, 178-183.

Mikó, Z., Ujszegi, J., Gál, Z., Hettyey, A.J.E., safety, e., 2017. Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. 140, 96-102.

Mojiri, A., Zhou, J.L., Ohashi, A., Ozaki, N., Kindaichi, T., 2019. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the total environment* 696, 133971.

Mouche, I., Malésic, L., Gillardeaux, O., 2017. FETAX assay for evaluation of developmental toxicity. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*, 311-324.

Newman, M., 2008. *Ecotoxicology: The history and present directions*. Encyclopedia of Ecology.

Newman, M.C., 1994. *Quantitative methods in aquatic ecotoxicology*. CRC press.

Nogueira, D.J., Mattos, J.J., Dybas, P.R., Flores-Nunes, F., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Schmidt, É.C., Bouzon, Z.L., Bicego, M.C., Melo, C.M., 2017. Effects of phenanthrene on early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789). *Aquatic toxicology* 191, 50-61.

Olivares-Rubio et al., 2021. Acetylcholinesterase activity in fish species exposed to crude oil hydrocarbons: A review and new perspectives. *Chemosphere* 264, 128401.

Ossana, N.A., Castañé, P.M., Salibián, A.J.A.o.e.c., toxicology, 2013. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). 65, 486-497.

Patar, A., Das, I., Giri, S., Giri, A., 2021. ZINC CONTAMINATION IS AN UNDERESTIMATED RISK TO AMPHIBIANS: TOXICITY EVALUATION IN TADPOLES OF FEJERVARYA LIMNOCHARIS. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 29, 489-498.

Peltzer, P.M., Boccioni, A.P.C., Maximiliano, A.A., Curi, L.M., Sandoval, M.T., Bassó, A., Martinuzzi, C.S., León, E.J., Lajmanovich, R.F., Lajmanovich, R.C., 2024. Hierarchical Levels of Biomarkers in Amphibian Tadpoles Exposed to Contaminants from Enzyme Disruptions to Etho-Toxicology Studies in Argentina, *Toxicology of Amphibian Tadpoles*. CRC Press, pp. 63-77.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Repetti, M.R., Sigrist, M.E., Beldoménico, H., 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety* 98, 142-151.

Peng, 2019. Chronic exposure to environmental concentrations of phenanthrene impairs zebrafish reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182, 109376.

Peng, X., Sun, X., Yu, M., Fu, W., Chen, H., Chen, J., 2019. Chronic exposure to environmental concentrations of phenanthrene impairs zebrafish reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182, 109376.

Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., Bustamante, P., 2016. Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Science of The Total Environment* 568, 952-966.

Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S.J.N., 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. 76, 116-129.

Pontes, L.P., Vafeiadou, A.-M., de França, F.J.L., Cavalcante, R.A., de Araujo Franca, D.A., Brito, C.M., Alves, R.N., de Carvalho, P.S.M., dos Santos, G.A.P., 2021. Toxic effects of phenanthrene intensify with an increase of temperature for the populations of a free-living nematode. *Ecological Indicators* 120, 106868.

Qin, L., Li, P., Gao, C., Fu, P., Wang, D., Wang, J., 2022. Development of seawater quality criteria for phenanthrene based on toxicity data of native species in the Bohai Sea. *Marine Pollution Bulletin* 183, 114045.

Ramdine, G., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: levels, bioavailability, and effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79, 80-89.

Rusković, M., 2021a. Combined effects of phenanthrene and polystyrene nanoplastics on amphibians: an in vivo and in vitro approach. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Department of biology.

Rusković, M., 2021b. Combined effects of phenanthrene and polystyrene nanoplastics on amphibians: an in vivo and in vitro approach. Master's Thesis. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology.

Sahoo, B.M., Ravi Kumar, B.V., Banik, B.K., Borah, P., 2020. Polyaromatic hydrocarbons (PAHs): structures, synthesis and their biological profile. *Current Organic Synthesis* 17, 625-640.

Salla, R.F., Pinto-Vidal, F.A., Boeing, G.A.N.S., Provase, M., Tsukada, E., Rocha, T.L., 2024. Developmental Abnormalities in Tadpoles as Biomarkers to Assess the Ecotoxicity of Traditional and Emerging Pollutants, *Toxicology of Amphibian Tadpoles*. CRC Press, pp. 303-326.

Santos, E.M., Almeida, A.V., Vasconcelos, S.D.J.I.S.Z., 2004. Feeding habits of six anuran (*Amphibia: Anura*) species in a rainforest fragment in Northeastern Brazil. 94, 433-438.

Schlenk, D., Celandier, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., van den Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in fishes. *The toxicology of fishes* 1.

Scott & Sloman et al., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. 68, 369-392.

Segalla, M.V., Berneck, B., Canedo, C., Caramaschi, U., Cruz, C.G., Garcia, P.d.A., Grant, T., Haddad, C.F., Lourenço, A.C.C., Mângia, S.J.H.B., 2021. List of Brazilian amphibians. 10, 121-216.

Sievers, M., Hale, R., Parris, K.M., Melvin, S.D., Lanctot, C.M., Swearer, S.E.J.S.o.t.T.E., 2019. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. 693, 133570.

Silman et al., 2008. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? 175, 3-10.

Slaby, S., Marin, M., Marchand, G., Lemiere, S.J.E.P., 2019. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environmental pollution* 248, 478-495.

Sodré, D., D'angiolella, A., Rocha, C., Sarmiento, D., Vallinoto, M., 2022. A hotspot of toad malformation in the Amazon.

Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S., 2010a. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. CRC Press.

Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K., 2010b. Recent advancements in amphibian and reptile ecotoxicology. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Taylor and Francis, New York, 1-14.

Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H., Wang, X., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319-1327.

Sutuyeva, L.R., Trudeau, V.L., Shalakhmetova, T.M., 2019. Mortality of embryos, developmental disorders and changes in biochemical parameters in marsh frog (*Rana ridibunda*) tadpoles exposed to the water-soluble fraction of Kazakhstan crude oil and O-xylene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 82, 200-215.

Thambirajah, A.A., Koide, E.M., Imbery, J.J., Helbing, C.C., 2019. Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology* 10, 276.

Tintignac, L.A., Brenner, H.-R., Rüegg, M.A.J.P.r., 2015. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. 95, 809-852.

Torreiro-Melo, A.G.A., Silva, J.S., Bianchini, A., Zanardi-Lamardo, E., de Carvalho, P.S.M., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Chemosphere* 132, 17-23.

Truter, J.C., van Wyk, J.H., Oberholster, P.J., Botha, A.M., Mokwena, L.M., 2017. An evaluation of the endocrine disruptive potential of crude oil water accommodated fractions and crude oil contaminated surface water to freshwater organisms using in vitro and in vivo approaches. *Environmental toxicology and chemistry* 36, 1330-1342.

USEPA, 2010. Guidelines for Deriving Numerical National Water Quality Criteria for the Protection Of Aquatic Organisms and Their Uses, in: Charles E. Stephen, D.I.M., David J. Hansen, John R. Gentile, Gary A. Chapman, and William A. Brungs (Ed.).

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.J.E.t., pharmacology, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13, 57-149.

Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T., Pechen De D'Angelo, A.M., 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8, 167-186.

Warsneski, A., Bitschinski, D., Rutkoski, C.F., Israel, N.G., Gonçalves, G.H.P., Lã, L., Guerreiro, F., Giasson, L.O.M., de Albuquerque, C.A.C., Hasckel, R.P., 2024. Fungicides from rice cultivation (tebuconazole and azoxystrobin) alters biochemical and histological markers of hammertoad tadpoles (*Boana faber*). *Environmental Pollution* 341, 122900.

Wickham, H., 2016. *Data analysis*. Springer.

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L.D.A., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J.J.J.o.o.s.s., 2019. *Welcome to the Tidyverse*. 4, 1686.

Wu, J.-Y., Yan, Z.-G., Liu, Z.-T., Liu, J.-d., Liang, F., Wang, X.-N., Wang, W.-L., 2015a. Development of water quality criteria for phenanthrene and comparison of the sensitivity between native and non-native species. *Environmental pollution* 196, 141-146.

Wu, J.Y., Yan, Z.G., Liu, Z.T., Liu, J., Liang, F., Wang, X.N., Wang, W.L., 2015b. Development of water quality criteria for phenanthrene and comparison of the sensitivity between native and non-native species. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 196, 141-146.

Wu, L., Zhong, L., Ru, H., Yao, F., Ni, Z., Li, Y., 2022. Thyroid disruption and growth inhibition of zebrafish embryos/larvae by phenanthrene treatment at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology* 243, 106053.

Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145, 288-293.

Zhang, H., Pan, L., Tao, Y., 2014. Toxicity assessment of environmental pollutant phenanthrene in clam *Venerupis philippinarum* using oxidative stress biomarkers. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 697-704.