



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE – PPGE CB

DINALMO FERREIRA BOTELHO VIEIRA

**Respostas letais e subletais de girinos neotropicais (Anura: Hylidae) expostos ao cobre
em diferentes condições térmicas**

Ilhéus - BA

2026

Dinalmo Ferreira Botelho Vieira

**Respostas letais e subletais de girinos neotropicais (Anura: Hylidae) expostos ao cobre
em diferentes condições térmicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual de Santa Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Área de concentração: Ecotoxicologia

Orientador: Dr. Alexandre Schiavetti

Coorientador: Dr. Mirco Solé Kienle

Coorientador: Dr. Renan Nunes Costa

Ilhéus - BA

2026

V658

Vieira, Dinalmo Ferreira Botelho.

Respostas letais e subletais de girinos neotropicais (Anura: Hylidae) expostos ao cobre em diferentes condições térmicas / Dinalmo Ferreira Botelho Vieira. – Ilhéus-BA: UESC, 2026.

94f.: il.

Orientador: Alexandre Schiavetti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade – PPGECEB.

Inclui referências.

1. Anfíbio. 2. Toxicologia. 3. Cobre. 4. Estresse oxidativo. 5. Sobrevivência. I. Título.

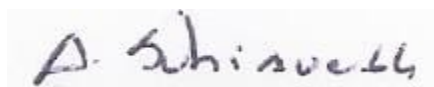
CDD 597.8

Dinalmo Ferreira Botelho Vieira

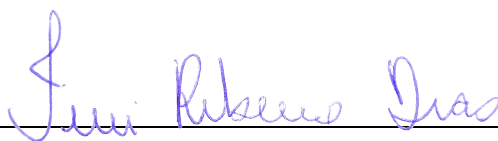
**Respostas letais e subletais de girinos neotropicais (Anura: Hylidae) expostos ao cobre
em diferentes condições térmicas**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Ecologia e Conservação da
Biodiversidade.

Ilhéus, março/2026



Dr. Alexandre Schiavetti
UESC (Orientador)



Dr. Iuri Ribeiro Dias

UESC

Dr. Caio Vinicius Mira-Mendes

UEMA

Dedico esse trabalho à minha família



AGRADECIMENTOS

Sou grato primeiramente à Deus por ter me concedido saúde e discernimento para chegar até essa etapa.

Agradeço à minha família por todo o incentivo para que eu embarcasse nessa jornada. Ao meu pai, Dinalmo Botelho, por todo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos dessa fase. À minha irmã, Cynthia Vieira, e minha namorada, Lara Maria, que foram a minha base emocional em todas as situações em que o medo e a insegurança tentaram me abalar. À minha mãe, Marluce Ferreira (*in memoriam*), obrigado pelos ensinamentos e valores que formaram o homem que eu sou hoje. Eu sei que mesmo de longe a senhora está orgulhosa do caminho que estou trilhando. Te Amo, mãe!

Sou grato ao meu orientador Alexandre Schiavetti e meu coorientador Mirco Solé, que mesmo à distância, sempre estiveram à disposição para me ajudar e sanar as dúvidas. Foram ensinamentos valiosos para que eu conseguisse concluir esse trabalho com êxito.

Também agradeço, especialmente, ao meu coorientador Renan Nunes Costa, pela ajuda e pelos ensinamentos durante as atividades de campo e de laboratório desenvolvidas no âmbito do projeto financiado pela FAPEMIG (APQ-03330-22; Edital 009/2022). Agradeço também pela paciência diante das minhas dificuldades e, sobretudo, pelo companheirismo. “Tamo junto moreno”.

Aos meus amigos de turma, muito obrigado por estarem comigo nos momentos de tensão e nos momentos de alegria, com vocês tudo ficava mais leve. Agradeço as brincadeiras, os conselhos e o companheirismo. Desejo sorte a cada um de vocês, e espero que a vida nos permita trabalhar juntos novamente. Vou levar vocês no meu coração.

Sou grato a UESC e a todo corpo docente do PPGECEB, que abriram as portas e me receberam com todo carinho para que eu chegasse até aqui. Foram inúmeros momentos de aprendizado, muitos conselhos, brincadeiras, confraternizações, mas, acima de tudo, muito trabalho. Agradeço as meninas da secretaria, Amábille e Mayra, por estarem sempre à disposição para ajudar seja qual for o problema, obrigado pelas boas conversas e momentos de descontração.

Por fim, agradeço pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

ÍNDICE

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 1.....	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	31
AGRADECIMENTOS.....	35
REFERENCIAS.....	36
FIGURAS E TABELAS.....	43
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	48
CAPÍTULO 2.....	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS.....	65
DISCUSSÃO.....	67
AGRADECIMENTOS.....	73
REFERENCIAS.....	73
FIGURAS E TABELAS.....	82
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	87
CONCLUSÃO GERAL.....	94

RESUMO

A perda de biodiversidade tem se intensificado nas últimas décadas, sendo impulsionada por múltiplos fatores de origem antrópica. Entre os principais fatores desse processo, a poluição destaca-se como uma das ameaças mais relevantes aos ecossistemas aquáticos, por comprometer a qualidade do habitat e afetar a sobrevivência das espécies. Dentre as formas de poluição, a liberação de metais no ambiente representa uma ameaça aos ecossistemas aquáticos. Na classe dos metais, o cobre ocorre naturalmente no ambiente e pode desempenhar um papel fisiológico essencial nas enzimas envolvidas na respiração celular. No entanto, atividades como agricultura e mineração intensificam a liberação de cobre nos ecossistemas aquáticos. Em concentrações que ultrapassam as necessidades fisiológicas, o cobre pode exercer toxicidade sobre os organismos expostos, por exemplo os anfíbios, que em fase larval podem absorver e acumular os contaminantes nas brânquias, pele e intestino. Após absorvido, o metal pode desencadear respostas nos girinos como estresse oxidativo, que por sua vez pode ocasionar efeitos letais e subletais. Além disso, anfíbios estão entre os grupos taxonômicos mais impactados pelo aumento da temperatura global, que tende a elevar a temperatura em corpos d'água, e pode reduzir as taxas de oxigênio dissolvido e, consequentemente aumentar a demanda metabólica dos girinos, os deixando mais suscetíveis à absorção do contaminante. Nesse sentido, o aumento da temperatura pode levar a efeitos aditivos e/ou sinérgicos da exposição do cobre sobre as espécies. Neste contexto, o objetivo geral dessa dissertação foi avaliar os efeitos letais e subletais de anfíbios anuros em fase larval expostos ao cobre isoladamente e sobre diferentes cenários de temperatura. No capítulo 1, foram realizados experimentos de exposição aguda e crônica, nos quais girinos de *Boana faber* foram expostos a concentrações crescentes de cobre (CuSO_4). Na exposição aguda, avaliamos a sobrevivência e mensuramos a CL_{50} 96h. Já na exposição crônica, analisamos efeitos comportamentais, bem como alterações na morfologia geral externa. No capítulo 2, foram realizados experimentos fatoriais de exposição aguda e crônica, nos quais girinos de *Scinax fuscovarius* foram expostos a combinações entre as concentrações de cobre (CuSO_4) e dois cenários de temperatura (ambiente= 25°C e alta= 30°C). Na exposição aguda, avaliamos a sobrevivência e mensuramos a CL_{50} 96h. Já na exposição crônica, analisamos efeitos comportamentais, bem como alterações na morfologia geral externa. Os resultados indicaram que, em *B. faber*, a exposição ao cobre reduziu a sobrevivência dos girinos, com CL_{50} 96h de 0,134 mg/L, não alterou o comportamento natatório, mas ocasionou alterações na morfologia externa. Já em *S. fuscovarius*, a sobrevivência também diferiu entre os tratamentos, entretanto, o aumento da temperatura não alterou a toxicidade do cobre (CL_{50} 96h = 0,235 mg/L a 25°C e 0,236 mg/L a 30°C), também não foram observadas alterações comportamentais e morfológicas nos girinos. De modo geral, nossos resultados contribuem para a compreensão dos efeitos da contaminação por cobre em girinos de anfíbios hilídeos neotropicais, utilizando *B. faber* e *S. fuscovarius* como modelos representativos de espécies amplamente distribuídas em ambientes aquáticos. Ao considerar a exposição a metais com variáveis ambientais, como a temperatura, nosso estudo reforça a importância de abordagens experimentais que considerem condições ecologicamente realistas. Nossos achados fornecem informações que podem contribuir com avaliações de risco ecológico e construção de curvas de sensibilidade de espécies tropicais, contribuindo para a definição de critérios de qualidade da água mais adequados à proteção de anfíbios neotropicais.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade; Sobrevivência; CL_{50} ; Comportamento; Morfometria

ABSTRACT

Biodiversity loss has intensified in recent decades, driven by multiple anthropogenic factors. Among the main drivers of this process, pollution stands out as one of the most relevant threats to aquatic ecosystems, as it compromises habitat quality and affects species survival. Among the forms of pollution, the release of metals into the environment represents a threat to aquatic ecosystems. Among metals, copper naturally occurs in the environment and may play an essential physiological role in enzymes involved in cellular respiration. However, activities such as agriculture and mining intensify the release of copper into aquatic ecosystems. At concentrations exceeding physiological requirements, copper can exert toxic effects on exposed organisms, such as amphibians, which during the larval stage can absorb and accumulate contaminants through the gills, skin, and intestine. Once absorbed, the metal can trigger responses in tadpoles such as oxidative stress, which in turn may cause lethal and sublethal effects. In addition, amphibians are among the taxonomic groups most affected by the increase in global temperature, which tends to raise the temperature of water bodies and may reduce dissolved oxygen levels and consequently increase the metabolic demand of tadpoles, making them more susceptible to contaminant absorption. In this context, increased temperature may lead to additive and/or synergistic effects of copper exposure on species. In this context, the general objective of this dissertation was to evaluate the lethal and sublethal effects on anuran amphibians in the larval stage exposed to copper alone and under different temperature scenarios. In Chapter 1, acute and chronic exposure experiments were conducted, in which tadpoles of *Boana faber* were exposed to increasing concentrations of copper (CuSO_4). In the acute exposure, survival was evaluated and the 96h LC_{50} was estimated. In the chronic exposure, behavioral effects as well as changes in general external morphology were analyzed. In Chapter 2, factorial experiments of acute and chronic exposure were conducted, in which tadpoles of *Scinax fuscovarius* were exposed to combinations of copper concentrations (CuSO_4) and two temperature scenarios (ambient = 25°C and high = 30°C). In the acute exposure, survival was evaluated and the 96h LC_{50} was estimated. In the chronic exposure, behavioral effects as well as changes in general external morphology were analyzed. The results indicated that, in *B. faber*, copper exposure reduced tadpole survival, with a 96h LC_{50} of 0.134 mg/L, did not alter swimming behavior, but caused changes in external morphology. In *S. fuscovarius*, survival also differed among treatments; however, the increase in temperature did not alter copper toxicity (96h LC_{50} = 0.235 mg/L at 25°C and 0.236 mg/L at 30°C), and no behavioral or morphological changes were observed in the exposed tadpoles. Overall, our results contribute to the understanding of the effects of copper contamination on tadpoles of Neotropical hyliid amphibians, using *B. faber* and *S. fuscovarius* as representative models of species widely distributed in aquatic environments. By considering metal exposure together with environmental variables such as temperature, our study reinforces the importance of experimental approaches that consider ecologically realistic conditions. Our findings provide information that may contribute to ecological risk assessments and to the construction of species sensitivity curves for tropical species, contributing to the definition of water quality criteria more suitable for the protection of Neotropical amphibians.

Keywords: Toxicity; Survival; LC_{50} ; Behavior; Morphometry

INTRODUÇÃO GERAL

A perda de biodiversidade tem se intensificado nas últimas décadas, sendo impulsionada por múltiplos fatores de origem antrópica que ameaçam os ecossistemas em escala global (CEBALLOS *et al.*, 2015; CEBALLOS *et al.*, 2020). Entre os principais fatores responsáveis pelo declínio de diversas espécies, estão as mudanças no uso da terra e do mar, a exploração direta dos organismos, as mudanças climáticas, a poluição e a introdução de espécies exóticas invasoras (IPBES, 2019; LUEDTKE *et al.*, 2023). Dentre esses fatores, a poluição química tem se destacado como um dos principais vetores de alteração dos ecossistemas aquáticos, especialmente devido à introdução contínua de contaminantes orgânicos e inorgânicos que afetam processos ecológicos, fisiológicos e populacionais de organismos aquáticos (AMOATEY e BAAWAIN, 2019).

A poluição dos ecossistemas aquáticos pode ocorrer de diversas formas. Uma delas é a liberação de metais no ambiente, frequentemente intensificada por atividades antrópicas em setores como o mineral e agrícola, além do descarte inadequado do esgoto doméstico e emissões atmosféricas de origem industrial (GUEDES *et al.*, 2005; CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024; GIROTTO *et al.*, 2020;). Os metais são liberados naturalmente nos ecossistemas aquáticos e algumas famílias metálicas, quando em concentrações naturais, podem exercer funções fisiológicas essenciais (BABY *et al.*, 2010; STANKOVIC *et al.*, 2014). No entanto, quando essas concentrações são elevadas e ultrapassam as necessidades fisiológicas, podem causar toxicidade a diversos organismos (AIGBERUA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2020; RUTHSATZ e GLOS, 2024). Esses elementos apresentam um comportamento dinâmico nos ecossistemas aquáticos, tendo sua biodisponibilidade fortemente influenciada pelas propriedades físico-químicas do ambiente (VÄÄNÄNEN *et al.*, 2018; ADAMS *et al.*, 2020). Além da disposição dos metais na coluna d'água, os sedimentos atuam como compartimentos de armazenamento e como fontes secundárias de metais, podendo remobilizá-los e reintroduzi-los na água, aumentando as chances de absorção desses elementos por organismos (MISHRA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; PEJMAN *et al.*, 2016). Nesse contexto, o aumento das concentrações de metais em ambientes aquáticos representa uma ameaça à integridade do ecossistema (AMOATEY e BAAWAIN, 2019).

Dentre os organismos que habitam os ambientes aquáticos, os anfíbios são o grupo de vertebrados com as maiores taxas de declínio populacional nos últimos anos, e atualmente apresentam cerca de 41% das espécies conhecidas em categorias de ameaças (CEBALLOS *et al.*, 2020; IUCN, 2025). Esses animais possuem características fisiológicas que aumentam sua vulnerabilidade à contaminação ambiental, como a alta permeabilidade da pele, a respiração cutânea e o ciclo de vida bifásico (grande parte das espécies) que aumenta a probabilidade de exposição a contaminantes em diferentes compartimentos do ambiente (GALLANT *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2024). Essa sensibilidade é ainda maior na fase larval desses organismos, pelo fato de que, na maioria das espécies, a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorrem externamente, com ovos sem casca protetora depositados geralmente na água. Após a eclosão, os girinos permanecem restritos aos corpos d'água ao longo de todo o período de desenvolvimento até a metamorfose (GALLANT *et al.*, 2007; SCHIESARI *et al.*, 2007; KELEPERTZIS *et al.*, 2012). Entre os anfíbios anuros, a família Hylidae está entre as mais diversas e amplamente distribuídas (FROST, 2026) e, para muitas espécies, a reprodução ocorre em poças temporárias, brejos e corpos d'água marginais frequentemente inseridos em paisagens antropizadas (urbanas, agrícolas e minerárias), onde a entrada de metais e outros contaminantes pode ser recorrente (BAKER *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2024). Assim, hílideos constituem modelos ecotoxicologicamente relevantes para avaliar como metais podem afetar o desenvolvimento larval e comprometer o recrutamento populacional em ambientes impactados.

No grupo dos metais, o cobre é um micronutriente essencial em baixas concentrações, atuando como cofator de enzimas envolvidas na respiração celular e na defesa antioxidante (NOR, 1985; ADAMS *et al.* 2020; PESCE *et al.* 2025). No entanto, quando presente em níveis elevados, sua exposição está associada a efeitos adversos sobre a biodiversidade, com respostas que variam de acordo com a espécie, a concentração e as condições físico-químicas do ambiente, sendo frequentemente associadas a relações negativas com a riqueza de espécies aquáticas (CALFEE e LITTLE, 2017; GOHER, 2019; PESCE *et al.*, 2025). Em girinos, concentrações elevadas de cobre promovem aumento da mortalidade (BRANDÃO *et al.*, 2011; AZIZISHIRAZI *et al.*, 2021) e desencadeiam efeitos subletais como redução do crescimento corporal, atraso no desenvolvimento, alterações morfológicas, estresse oxidativo, além de comprometer o desempenho natatório (CHEN *et al.*, 2007; GARCÍA-

MUÑOZ *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2020). Em conjunto, esses efeitos comprometem o ciclo de vida das espécies, que tende a ser menor em ambientes com maiores concentrações de cobre (RUTHSATZ e GLOS, 2024).

Além da contaminação por metais, as variações extremas de temperatura provenientes das mudanças climáticas se encaixam como importante fator de estresse para os anfíbios (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2023). A temperatura atua como um fator ambiental capaz de influenciar as respostas fisiológicas dos organismos (FONTENOT JR. e LUTTERSCHMIDT, 2011; FREITAS *et al.*, 2017a), de modo que variações térmicas resultam em efeitos subletais em girinos durante o desenvolvimento (MURATA e YAMAUCHI, 2005; FREITAS *et al.*, 2017b; GREEN e SALICE, 2020). Apesar de seus efeitos diretos, a temperatura exerce um papel modulador sobre a toxicidade de contaminantes em anfíbios, influenciando tanto as propriedades químicas dos poluentes quanto as respostas fisiológicas dos organismos expostos (NOYES *et al.*, 2009; HOOPER *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2016). Nos ambientes aquáticos, as temperaturas elevadas tendem a reduzir os níveis de oxigênio dissolvido e a aumentar a demanda metabólica dos organismos, o que pode ampliar a suscetibilidade aos efeitos de xenobióticos (BLAUSTEIN *et al.*, 2010; KAUR *et al.*, 2011; MOE *et al.*, 2013). Além disso, em águas com temperaturas elevadas, as reações químicas ocorrem de forma mais acelerada, favorecendo o aumento da biodisponibilidade e a intensificação dos efeitos tóxicos dos contaminantes (MIDDLEBROOKS *et al.*, 1973; HRDINKA *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2017a). Por outro lado, em alguns casos o aumento da temperatura pode reduzir o tempo de exposição aquática e, conseqüentemente, a toxicidade total (ROHR *et al.*, 2011).

A reprodução da maioria das espécies de anfíbios, e conseqüentemente o aumento no número de girinos nos ambientes aquáticos, ocorre principalmente durante a estação chuvosa, quando há maior disponibilidade de água (ETEROVICK *et al.*, 2020; PROVETE *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2017a; FROST, 2026). No Brasil, essa estação está associada ao verão, quando se registram as maiores médias de temperatura do ano. Nesse período, temperaturas atmosféricas elevadas favorecem a evaporação e a redução do volume de água em poças temporárias, o que pode resultar no aumento da temperatura da água e na intensificação das variações térmicas diárias nesses ambientes (MANN *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2016).

Nesse contexto, considerando que os impactos isolados tanto da contaminação por metais quanto do aumento da temperatura, comprometem o desenvolvimento e a sobrevivência dos anfíbios, é esperado que, ao atuarem simultaneamente, esses efeitos possam ser aditivos e/ou sinérgicos, amplificando assim o risco para as espécies de anfíbios.

Diante desse cenário, embora as regiões tropicais concentrem grande parte da biodiversidade de anfíbios (PILLAY *et al.*, 2022), ainda há escassez de dados ecotoxicológicos sobre os efeitos de contaminantes em espécies tropicais nativas, o que aponta para uma lacuna no conhecimento acerca da sensibilidade de anfíbios sob as condições ambientais típicas de ecossistemas tropicais (GHOSE *et al.*, 2014). Diante disso, a presente dissertação foi baseada na avaliação dos efeitos letais e subletais de anfíbios anuros submetidos à contaminação por cobre e o incremento da temperatura. A dissertação foi estruturada em dois capítulos:

No capítulo 1, intitulado “Efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em girinos de *Boana faber* (Anura: Hylidae)”, foram realizados experimentos laboratoriais com o intuito de analisar respostas letais (mortalidade e CL₅₀) e subletais (comportamento e morfologia geral externa) de girinos de *B. faber* expostos a um contaminante antrópico (concentrações de cobre). Considerando o potencial tóxico do cobre sobre os girinos, esperamos que o aumento das concentrações resulte em redução da sobrevivência, além de ocasionar alterações morfológicas e comportamentais.

No capítulo 2, intitulado “Efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em diferentes cenários de temperatura em girinos de *Scinax fuscovarius* (Anura: Hylidae)”, foram realizados experimentos laboratoriais fatoriais com o intuito de mensurar respostas letais (mortalidade e CL₅₀) e subletais (comportamento e morfologia geral externa) de girinos submetidos a dois fatores oferecidos individualmente e em conjunto, sendo um natural (aumento da temperatura) e outro antrópico (concentrações de cobre). Considerando o potencial tóxico do cobre e a influência da temperatura sobre o metabolismo larval e a toxicidade do metal, espera-se que o aumento das concentrações reduza a sobrevivência e provoque alterações morfológicas e comportamentais nos girinos, sendo esses efeitos intensificados sob temperatura elevada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W. et al. **Bioavailability assessment of metals in freshwater environments: A historical review**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2020, v. 39, n. 1, p. 48–59.
- AIGBERUA, A. O.; TARAWOU, J. T.; ABASI, C. Y. **Effect of oxidation-reduction fluctuations on metal mobility of speciated metals and arsenic in bottom sediments of Middleton River, Bayelsa State, Nigeria**. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 2018, v. 22, n. 9, p. 1511–1517.
- AMOATEY, P.; BAAWAIN, M. S. **Effects of pollution on freshwater aquatic organisms**. Water Environment Research, 2019, v. 91, n. 10, p. 1272–1287.
- AZIZISHIRAZI, A.; KLEMISH, J. L.; PYLE, G. G. **Sensitivity of amphibians to copper**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2021, v. 40, n. 7, p. 1808–1819.
- BABY, J. et al. **Toxic effect of heavy metals on aquatic environment**. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2010, v. 4, n. 4.
- BAKER, N. J.; BANCROFT, B. A.; GARCIA, T. S. **A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians**. Science of the Total Environment, 2013, v. 449, p. 150–156.
- BLAUSTEIN, A. R. et al. **Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations**. Diversity, 2010, v. 2, n. 2, p. 281–313.
- BRANDÃO, F. P. et al. **Influência da temperatura na toxicidade do cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezii***. Revista Captar, 2011, v. 3, n. 1, p. 66–77.
- CALFEE, R. D.; LITTLE, E. E. **Toxicity of cadmium, copper, and zinc to the threatened Chiricahua leopard frog (*Lithobates chiricahuensis*)**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, v. 99, n. 6, p. 679–683.
- CARVALHO, C. S.; PINTO-VIDAL, F. A. Ecotoxicological impacts of metals on amphibian tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 13, p. 270–302.
- CEBALLOS, G. et al. **Accelerated modern human-induced species losses: entering the sixth mass extinction**. Science Advances, 2015, v. 1, n. 5.
- CEBALLOS, G.; EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. **Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, v. 117, n. 24, p. 13596–13602.
- CHEN, Te-Hao; GROSS, J. A.; KARASOV, W. H. **Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*)**. Environmental Toxicology

and Chemistry, 2007, v. 26, n. 7, p. 1470–1475.

COSTA, A. G.; BORGES, Á. M.; SOTO-BLANCO, B. **Metais tóxicos e seus efeitos sobre a reprodução dos animais**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 2020, v. 14, n. 1, p. 108–124.

COSTA, R. N. et al. How pollutants are affecting amphibian tadpoles: relationship with anthropogenic pollutants and perspectives for the future. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 1, p. 1–26.

ETEROVICK, P. C.; SOUZA, A. M.; SAZIMA, I. **Anuran Amphibians from the Serra do Cipó**. Gráfiön Estúdio Editorial, 2020.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA C. L. N. **Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax***. Journal of Integrated Coastal Zone Management, 2010, v. 10, n. 2, p. 229–241.

FONTENOT JR, C. L.; LUTTERSCHMIDT, W. I. **Thermal selection and temperature preference of the aquatic salamander, *amphiuma tridactylum***. Herpetological Conservation and Biology, 2011, v. 6, n. 3, p. 395–399.

FREITAS, J. S. et al. **Influence of temperature on the thyroidogenic effects of Diuron and its metabolite 3, 4-DCA in tadpoles of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*)**. Environmental Science & Technology, 2016, v. 50, n. 23, p. 13095–13104.

FREITAS, J. S. et al. **Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®)**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2017a, v. 197, p. 32–44.

FREITAS, J. S. et al. **Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles**. Chemosphere, 2017b, v. 185, p. 548–562.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.1. Nova York: American Museum of Natural History, 2026. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org>. Acesso em: 08/01/2026.

GALLANT, A. L. et al. **Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation**. Copeia, v. 2007, n. 4, p. 967–979.

GARCÍA-MUÑOZ, E.; GUERRERO, F.; PARRA, G. **Effects of copper sulfate on growth, development and escape behavior**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, v. 56, n. 3, p. 557–565.

- GHOSE, S. L. et al. **Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2014, v. 33, n. 9, p. 2114–2119.
- GIROTTI, L. et al. **Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the dam rupture in Mariana, MG (Brazil)**. Water, Air, & Soil Pollution, 2020, v. 231, n. 7, p. 325.
- GOHER, M. E.; ALI, M. H.H.; EL-SAYED, S. M. **Heavy metals contents in Nasser Lake and the Nile River, Egypt: An overview**. Egyptian Journal of Aquatic Research, 2019, v. 45, n. 4, p. 301–312.
- GREEN, F. B.; SALICE, C. J. **Increased temperature and lower resource quality exacerbate chloride toxicity to larval *Lithobates sylvaticus* (wood frog)**. Environmental Pollution, 2020, v. 266.
- GUEDES, J. A.; LIMA, R. F. S.; Souza L. C. **Metais pesados em água do rio Jundiá-Macaíba/RN**. Revista de Geologia, 2005, v. 18, n. 2, p. 131–142.
- HOOVER, M. J. et al. **Interactions between chemical and climate stressors: a role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, v. 32, n. 1, p. 32–48.
- HRDINKA, T. et al. **Possible impacts of climate change on water quality in streams of the Czech Republic**. Hydrological Sciences Journal, 2015, v. 60, n. 2, p. 192–201.
- INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES (IPBES). **Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**. Editores: S. Díaz, J. Settele, E. S. Brondízio *et al.* Bonn, Germany: IPBES Secretariat, 2019. 56 p. Disponível em: <https://www.ipbes.net/global-assessment>. Acesso em: 7/09/2025.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2025-2. Gland, Suíça: IUCN, 2025. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 08/01/2026.
- IUCN SSC AMPHIBIAN SPECIALIST GROUP. **State of the World's Amphibians: the second global amphibian assessment**. [Texas, EUA]: Re:wild; Gland, Suíça: IUCN, 2023. Disponível em: <https://www.iucn-amphibians.org/state-of-the-worlds-amphibians/> Acesso em: 08/01/2026.
- KAUR, M. et al. **The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch**. Chemico-Biological Interactions, 2011, v. 193, n. 3, p. 216–224.
- KELEPERTZIS, E. et al. **Distribution and Accumulation of Metals in Tadpoles Inhabiting the Metalliferous Streams of Eastern Chalkidiki, Northeast Greece**.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, v. 63, n. 3, p. 409–420.

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

MANN, R. M. et al. **Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment.** Environmental Pollution, 2009, v. 157, p. 2903–2927.

MIDDLEBROOKS, E. J. et al. **Effects of temperature on the toxicity to the aquatic biota of waste discharges: a compilation of the literature.** Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, 1973.

MISHRA, V. K. et al. **Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent.** Monitoramento e Avaliação Ambiental , 2008, v. 141, n. 1, p. 49–58.

MOE, S. J. et al. **Combined and interactive effects of climate change and toxic substances.** Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, v. 32, p. 49–61.

MURATA, T.; YAMAUCHI, K. **Low temperature arrest of thyroid hormone–dependent transcription.** Endocrinology, 2005, v. 146, p. 256–264.

NOYES, P D. et al. **The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world.** Environment International, 2009, v. 35, p. 971–986.

NOR, Y. M. **Ecotoxicity of copper to aquatic biota.** Environmental Research, 1985, v. 43, n. 1, p. 274–282.

PEJMAN, A. et al. **Fractionation of heavy metals in sediments and assessment of their availability risk: A case study in the northwestern of Persian Gulf.** Marine Pollution Bulletin, 2016, v. 114, p. 881–887.

PESCE, S. et al. **The use of copper as plant protection product contributes to environmental contamination and resulting impacts on terrestrial and aquatic biodiversity and ecosystem functions.** Environmental Science and Pollution Research, 2025, v. 32, n. 6, p. 2830–2846.

PILLAY, R. et al. **Tropical forests harbor more than half of the world's vertebrate species.** Frontiers in Ecology and the Environment, 2022, v. 20, n. 1, p. 10–15.

PROVETE, D. B. et al. **Anuranfauna from northwestern region of the State of São Paulo: species list and taxonomic key for adults.** Biota Neotropica, 2011, v. 11, p. 377–391.

ROHR, Jason R. et al. **Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians?: partitioning effects on exposure and susceptibility to contaminants.** Global Change Biology, 2011, v. 17, p. 657–666.

RUTHSATZ, K.; GLOS, J. Effects of pollutants on the endocrine system of tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 5, p. 78–110.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. **Biogeographic Biases in Research and Their Consequences for Linking Amphibian Declines to Pollution**. Conservation Biology, 2007, v. 21, p. 465–471.

STANKOVIC, S.; KALABA, P.; STANKOVIC, A. R. **Biota as toxic metal indicators**. Environmental Chemistry Letters, 2014, v. 12, p. 63–84.

VÄÄNÄNEN, K. et al. **Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems: From science to environmental management**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, v. 147, p. 430–446.

CAPÍTULO 1

Efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em girinos de *Boana faber* (Anura: Hylidae)

Dinalmo Ferreira Botelho Vieira, Stephano Moraes Almeida, Sthefany dos Santos Souza, Alexandre Schiavetti, Mirco Solé, Renan Nunes Costa.



Fonte: Dubeux et al. 2020

Manuscrito a ser submetido a revista *Ecotoxicology*

Efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em girinos de *Boana faber* (Anura: Hylidae)

Dinalmo Ferreira Botelho Vieira¹, Stephano Moraes Almeida², Sthefany dos Santos Souza², Alexandre Schiavetti¹, Mirco Solé¹, Renan Nunes Costa².

1 - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

2 - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade Carangola, Praça dos Estudantes, nº 23, Bairro Santa Emília, Carangola, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

Metais ocorrem naturalmente nos ecossistemas aquáticos e, em baixas concentrações, o cobre desempenha funções fisiológicas essenciais nos organismos. No entanto, o aumento de suas concentrações, decorrente de atividades antrópicas como agricultura e mineração, pode comprometer a homeostase, induzir estresse oxidativo e causar efeitos letais e subletais. Anfíbios são particularmente suscetíveis à contaminação por metais devido à elevada permeabilidade da pele, à respiração cutânea e ao ciclo de vida bifásico, com maior sensibilidade durante a fase larval. Neste estudo, avaliamos experimentalmente os efeitos letais e subletais da exposição ao cobre (CuSO_4) em girinos de *Boana faber*. Foram conduzidos experimentos laboratoriais de exposição aguda (96 h) e crônica (21 dias), utilizando concentrações crescentes de cobre. Na exposição aguda, foi avaliada a sobrevivência e estimada a $\text{CL}_{50/96\text{h}}$. Na exposição crônica, os girinos foram submetidos a concentrações subletais correspondentes a 20% e 40% da CL_{50} , sendo analisadas respostas comportamentais relacionadas à natação e alterações na morfologia geral externa. A sobrevivência diferiu entre os tratamentos, com elevada mortalidade na maior concentração testada; e a $\text{CL}_{50/96\text{h}}$ foi estimada em 0,134 mg/L. A exposição ao cobre não afetou o comportamento natatório. Entretanto, foram observadas alterações morfológicas, incluindo mudanças na forma do corpo e da cauda. Os resultados indicam que concentrações ambientalmente relevantes de cobre podem reduzir a sobrevivência e induzir efeitos subletais em girinos de *B. faber*, contribuindo para o entendimento da sensibilidade de anfíbios neotropicais à contaminação por metais e fornecendo subsídios para avaliações de risco ecológico em ecossistemas aquáticos tropicais.

Palavras-chave: Toxicidade, Sobrevivência, CL_{50} , Comportamento, Morfologia

ABSTRACT

Metals occur naturally in aquatic ecosystems, and at trace concentrations copper plays essential physiological roles in aquatic organisms. However, elevated copper levels resulting from anthropogenic activities such as agriculture and mining can disrupt homeostasis, induce oxidative stress, and cause lethal and sublethal effects. Amphibians are particularly vulnerable to metal contamination due to their permeable skin, cutaneous respiration, and biphasic life cycle, with sensitivity being especially pronounced during the larval stage. In this study, we experimentally evaluated the lethal and sublethal effects of copper (CuSO_4) exposure on tadpoles of the Neotropical tree frog *Boana faber*. Acute (96 h) and chronic (21 d) laboratory exposures were conducted using increasing copper concentrations. In the acute assay, survival was assessed and the 96 h median lethal concentration (LC_{50}) was estimated. In the chronic assay, tadpoles were exposed to sublethal concentrations corresponding to 20% and 40% of the LC_{50} , and behavioral (swimming performance) and morphological responses were evaluated. Survival differed significantly among treatments, with the highest concentration causing marked mortality, and the $\text{LC}_{50/96\text{h}}$ was estimated at 0.134 mg/L. Copper exposure did not significantly affect swimming behavior; however, clear alterations in external morphology were detected, including changes in body shape and tail structure. These results indicate that environmentally relevant copper concentrations can reduce survival and induce morphological effects in *B. faber* tadpoles. Our findings contribute to understanding the sensitivity of Neotropical amphibians to copper contamination and provide data relevant for species sensitivity distributions and ecological risk assessments in tropical freshwater ecosystems.

Keywords: Toxicity, Survival, LC_{50} , Behavior, Morphology

INTRODUÇÃO

Os metais são elementos químicos que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos (BABY *et al.*, 2010). Algumas famílias metálicas, quando em concentrações naturais, exercem funções fisiológicas essenciais para diversos organismos, atuando como cofatores de enzimas no processo de respiração celular (STANKOVIC *et al.*, 2014; ADAMS *et al.* 2020; PESCE *et al.* 2025), porém, podem causar toxicidade quando as concentrações ultrapassam as necessidades fisiológicas (AIGBERUA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2020; RUTHSATZ e GLOS, 2024). Esses elementos são amplamente estudados devido à sua ocorrência no ambiente e ao seu potencial tóxico para a vida aquática (ADAMS *et al.*, 2020). Os metais se comportam de forma dinâmica nos ecossistemas aquáticos, tendo sua biodisponibilidade e toxicidade fortemente influenciadas pelas propriedades físico-químicas do ambiente, como por exemplo, potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido, temperatura, dureza e presença de matéria orgânica e inorgânica (VÄÄNÄNEN *et al.*, 2018; ADAMS *et al.*, 2020). Além da coluna d'água, os sedimentos atuam como reservatórios de metais, nos quais esses elementos encontram-se adsorvidos. Contudo, a depender das condições físico-químicas, podem ser uma fonte secundária de liberação de metais para a coluna d'água (MISHRA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; PEJMAN *et al.*, 2016). Nesse sentido, aumento das concentrações de metais em ambientes aquáticos representa uma ameaça à integridade do ecossistema, tornando a qualidade das águas doces essenciais para a conservação da biodiversidade (AMOATEY e BAAWAIN, 2019).

Entre os organismos que habitam ecossistemas aquáticos, os anfíbios se destacam como o grupo de vertebrados com as maiores taxas de declínios populacionais e extinções em escala global (ALLENTOFT e O'BRIEN, 2010; CEBALLOS *et al.*, 2020; LUEDTKE *et al.*, 2023). A Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), aponta que cerca de 41% das espécies de anfíbios conhecidas estão sob risco de extinção (IUCN, 2025). Esse cenário está associado a fatores como perda e fragmentação de habitats, poluição, mudanças climáticas, disseminação de doenças, introdução de espécies exóticas e a exploração excessiva, considerados os principais responsáveis para esses declínios (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2023). De forma geral, os anfíbios são amplamente distribuídos e apresentam alta sensibilidade a estressores ambientais, e por isso, são considerados bioindicadores de qualidade ambiental (KELEPERTZIS *et al.*, 2012). Além

disso, os anfíbios apresentam alta plasticidade fenotípica, característica que os torna bons modelos para estudos ecotoxicológicos de curta duração, uma vez que respondem rapidamente a mudanças nas condições ambientais (VAN BUSKIRK e RELYEA, 1998; VAN BUSKIRK, 2009). A sensibilidade dos anfíbios está diretamente relacionada às suas particularidades fisiológicas, como a pele altamente permeável, a respiração cutânea e ciclo de vida bifásico (GALLANT *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2024a). Essa vulnerabilidade pode ser intensificada durante o estágio de ovo e larval (i.e. girinos), uma vez que a maioria das espécies realizam a fertilização e desenvolvimento embrionário fora do corpo materno, além de apresentarem ovos sem casca protetora depositados diretamente na água (COSTA *et al.*, 2024a). Durante todo o desenvolvimento, os girinos permanecem confinados em corpos d'água e podem estar continuamente expostos a potenciais contaminantes (GALLANT *et al.*, 2007; SCHIESARI *et al.*, 2007; KELEPERTZIS *et al.*, 2012).

A contaminação por metais pode desestabilizar a homeostase em girinos e induzir efeitos tóxicos, resultando em prejuízos aos processos fisiológicos, podendo contribuir para os declínios populacionais (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). A entrada dos metais nos girinos pode ocorrer tanto pela absorção direta por via das brânquias e pele, quanto pelo trato gastrointestinal com a ingestão de sedimentos contaminados (GIROTTTO *et al.*, 2020; GUEZGOUZ *et al.*, 2021; SCHLENK e ALMEIDA, 2024). Neste contexto, muitas espécies de anfíbios realizam a oviposição em ambientes aquáticos situados em locais próximos a áreas urbanas, industriais, agrícolas e mineradoras, frequentemente expostos à contaminação por metais e outros poluentes químicos provenientes dessas atividades antrópicas (BAKER *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2024 a,b). Como exemplo disso, o desastre ambiental do rompimento da barragem de minérios de Fundão, ocorrido em Mariana-MG no ano de 2015, elucida como as atividades antrópicas podem causar a liberação exacerbada de metais nos ambientes aquáticos, resultando em consequências diretas sobre os anfíbios (e.g. FREITAS *et al.*, 2016; GIROTTTO *et al.*, 2020). O laudo técnico preliminar dos impactos ambientais decorrentes do desastre, realizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2015), apresenta alterações nos níveis de diferentes tipos de metais presentes nas áreas diretamente afetadas.

Dentre eles, o cobre se destaca como um elemento de preocupação, pois, embora seja um micronutriente essencial para o metabolismo, pode exercer toxicidade em concentrações que excedem os limites fisiológicos (HOSSAIN e RAKKIBU, 1999; ADAMS *et al.* 2020; SMRITI *et al.*, 2023). Associado a isso, as concentrações de cobre nos ambientes aquáticos normalmente são elevadas por efluentes de atividades industriais, mineração e agricultura (GOHER, 2019 PESCE *et al.*, 2025). Nesse contexto, diversos estudos ecotoxicológicos abordam os efeitos letais e subletais da contaminação por cobre sobre girinos (GÜRKAN e HAYRETDAG, 2012; NATIONS *et al.*, 2015; AZIZISHIRAZI, 2021). Os estudos apontam efeitos como a redução na sobrevivência (CHEN *et al.*, 2007; LANCE *et al.*, 2013; NATIONS *et al.*, 2015), alterações na morfologia (PELTZER *et al.*, 2013; CHAI *et al.*, 2014), atraso no desenvolvimento (PELES, 2013; RUMRILL *et al.*, 2016) e alterações comportamentais (GARCÍA-MUÑOZ *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2020). Esses efeitos, combinados ou não, podem comprometer o desenvolvimento e a sobrevivência dos girinos, reduzindo o número de indivíduos que alcançam a fase adulta e a contribuição desses indivíduos para a manutenção das populações (RUTHSATZ e GLOS, 2024). Todavia, embora diversos estudos abordem os efeitos dos metais em anfíbios, a maior parte desses dados é proveniente de pesquisas realizadas predominantemente em regiões temperadas (AZIZISHIRAZI, 2021). Apesar das regiões tropicais abrigarem a maior parte da biodiversidade de anfíbios (PILLAY *et al.*, 2022), existe uma carência de dados ecotoxicológicos sobre o efeito dos contaminantes sobre as espécies tropicais nativas, o que evidencia uma lacuna no conhecimento sobre a sensibilidade de anfíbios nativos brasileiros sob condições ambientais de ecossistemas tropicais (GHOSE *et al.*, 2014).

Neste contexto, o nosso objetivo foi analisar experimentalmente os efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre sobre girinos da espécie *Boana faber* (Anura: Hylidae). De forma específica, para efeitos letais, mensuramos a taxa de sobrevivência em concentrações crescentes de cobre, além de calcular o CL₅₀ 96h da espécie. Para efeitos subletais, analisamos alterações na morfologia geral externa dos girinos expostos a contaminação em vista lateral e dorsal por meio de técnicas de morfometria geométrica. Além disso, analisamos se há mudanças comportamentais na atividade natatória por meio da avaliação da distância total percorrida e da velocidade máxima atingida, além da média de velocidade máxima atingida pelos girinos expostos a contaminação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de espécimes e sistema experimental

Utilizamos como modelo a espécie *Boana faber*, um anfíbio amplamente distribuído na Argentina, Brasil e Paraguai (FROST, 2026), que apresenta um ciclo reprodutivo vinculado à estação chuvosa, no qual os machos escolhem ambientes aquáticos específicos para construir os ninhos onde, posteriormente, as fêmeas depositam os ovos (MARTINS e HADDAD, 1988). Coletamos três desovas de *Boana faber* em fevereiro de 2025, em um corpo d'água lântico no município de Carangola-MG, localizado na zona rural, em um fragmento de mata livre de atividades agrícolas ou industriais, (20°43'57.8"S 41°58'26.3"W). As desovas foram coletadas no mesmo dia, manualmente, sendo acondicionadas em sacos plásticos com água do respectivo local e foram levadas ao laboratório experimental do Museu de Zoologia Newton Baião de Azevedo (MZNB) da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), unidade de Carangola. Em laboratório e sob condições controladas (temperatura média do ar = 25 °C ± 0,8 °C; fotoperíodo 12h claro/12h escuro), as desovas foram reunidas em um único aquário de armazenamento (bandeja plástica com 60x40x9cm com a capacidade de ~17L), onde permaneceram até a eclosão e o desenvolvimento dos girinos até o estágio 25 (GOSNER, 1960). Os girinos livres natantes se misturaram e reduziram o viés do efeito parental sobre os experimentos. Os girinos foram alimentados *ad libitum* a cada dois dias com ração para peixes ornamentais.

Como unidades experimentais (u.e.), utilizamos potes plásticos com 500ml d'água descloretada, sem adição de substrato e sem oxigenação artificial. As posições das u.e. foram aleatorizadas por meio de sorteio entre os tratamentos. Os girinos foram aclimatados nas u.e. por um período de 24 horas antes do início das exposições.

Para definição dos níveis de cobre a serem testados, utilizamos o composto químico sulfato de cobre (CuSO₄) em pó (Sigma-Aldrich, 451657). O ponto de partida das concentrações utilizadas nos experimentos foi baseado nos valores observados na resolução CONAMA nº 357/2005, para águas doces de Classe III no Brasil (BRASIL, 2005). Com base no referencial máximo permitido na resolução, aumentamos as concentrações gradativamente a partir de ensaios pilotos realizados com a espécie, bem como experimentos

com outras espécies já conduzidos (*artigo em preparação*). Para a preparação da solução estoque, adicionamos 0,025g de CuSO_4 em 200ml de água destilada para obter uma solução com 49,5 mg/L de cobre, e a partir da solução estoque realizamos as pipetagens para cada tratamento. Ao final dos experimentos, os girinos sobreviventes foram mortos em solução de benzocaína (100 mg/l) e conservados em solução de formol a 10%. Todo o material testemunho será depositado na coleção de girinos do MZNB (UEMG – Carangola - MG). Os espécimes foram coletados sob a licença SISBIO 80519-1 (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) e a experimentação foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEMG, conforme o protocolo 007/2022.

Experimento de exposição aguda

Preparamos e aplicamos em dose única as seguintes concentrações de cobre: Controle= 0 mg/L, T1= 0.025 mg/L, T2= 0.05 mg/L, T3= 0.1 mg/L, T4= 0.2 mg/L e T5= 0.4 mg/L. Replicamos cada tratamento quatro vezes, totalizando 24 u.e. Em cada u.e. inserimos cinco girinos no estágio 25 (GOSNER, 1960), coletados aleatoriamente do aquário de armazenamento, totalizando 120 girinos testados. A exposição aguda teve a duração total de 4 dias (i.e., 96h), sendo revisado a cada 24h para contagem do número de girinos sobreviventes e retirada de indivíduos mortos. Ao final do experimento, avaliamos a sobrevivência nos diferentes tratamentos, que também foi utilizada para definição da concentração letal para 50% da população testada (CL_{50} 96h). Além disso, no último dia de exposição, mensuramos as variáveis potencial hidrogeniônico (pH), concentração de sais dissolvidos na água (TDS), condutividade, e oxigênio dissolvido (O_2 dissolvido) em cada u.e.

Experimento de exposição crônica

Utilizamos as seguintes concentrações: Controle = 0 mg/L; T1= 20% da CL_{50} 96h (a saber: 0.0268 mg/L de cobre) e T2= 40% CL_{50} 96h (a saber: 0.0536 mg/L de cobre). Utilizamos estes valores com o intuito de garantir maior sobrevivência durante um maior intervalo de tempo, visando a exposição em níveis crônicos. Também inserimos cinco girinos em cada u.e. Replicamos cada tratamento 10 vezes, totalizando 150 girinos e 30 u.e. O experimento teve a duração total de 21 dias (i.e., 504h). Revisamos as u.e. a cada 24h para

verificação e retirada de indivíduos mortos. Buscando manter a mesma intensidade do contaminante durante toda a exposição, trocamos a água e refizemos a contaminação em cada u.e. a cada quatro dias, evitando assim a redução do efeito do contaminante ao longo do tempo. Os girinos foram alimentados 24h antes da troca de água e recontaminação. Ao final da exposição, também mensuramos o pH, TDS, condutividade, O₂ dissolvido em cada u.e.

Ao final do experimento, coletamos aleatoriamente 15 girinos de cada tratamento para avaliação da morfologia geral externa. Com o auxílio de gel de ultrassom e água, posicionamos os girinos em uma placa de Petri e fotografamos cada indivíduo em vista lateral e dorsal para avaliação das variações na forma através de técnicas de morfometria geométrica. As imagens foram obtidas sempre na mesma posição e altura com o auxílio de uma câmera Canon EOS Rebel T100, equipada com a lente EF-S 18-55mm, em um tripé com 50 cm de altura. Posteriormente, em cada girino definimos 25 *landmarks* (marcos anatômicos em pontos homólogos) em vista lateral (modificado de VAN BUSKIRK, 2009; ARENDT, 2010; KATZENBERGER *et al.*, 2014 - Figura - S1) e 16 *landmarks* em vista dorsal (MARQUES e NOMURA, 2015 - Figura – S2), seguindo metodologias utilizadas em análises morfométricas em girinos (MARQUES e NOMURA, 2015; SHERRATT *et al.*, 2018; ILIĆ *et al.*, 2019). As configurações de *landmarks* fornecem um sistema de coordenadas em um plano cartesiano que representa a forma do corpo dos organismos, representando variações na forma bruta, sem efeitos de tamanho, posição ou rotação (MARQUES e NOMURA, 2015). Os *landmarks* foram digitalizados com auxílio dos softwares tpsUtil e tpsDig2.

Para análises comportamentais, os girinos foram separados de acordo com seus respectivos tratamentos e transferidos para aquários de armazenamento contendo água proveniente das unidades experimentais correspondentes, a fim de manter as condições físico-químicas da água. Em seguida, 15 girinos de cada tratamento foram escolhidos aleatoriamente e adicionados individualmente em uma bandeja, redonda (50 cm de diâmetro), com 1L de água de seu respectivo aquário de armazenamento, para análise da atividade natatória. Cada girino foi filmado por 1 minuto e 30 segundos, sendo estimulado a cada 30 segundos com um leve toque na cauda utilizando um bastão de vidro. Ao término das gravações, foram mensuradas as seguintes variáveis comportamentais: (I) distância total percorrida (em cm), (II) velocidade máxima atingida no 1º estímulo (em cm/s) e (III) média

da velocidade máxima atingida (em cm/s), que foi mensurada por meio da média calculada a partir da velocidade máxima atingida a cada estímulo. As variáveis comportamentais relacionadas à atividade natatória foram mensuradas com auxílio do software Kinovea versão 2023.1.2

Análises estatísticas

Experimento de exposição aguda

Para comparar a sobrevivência dos girinos entre os diferentes tratamentos, aplicamos um teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn *a posteriori*. A concentração letal para 50% da população testada (CL₅₀ 96h) foi estimada por meio de uma Regressão Linear pelo método Probit. Por meio de ANOVAs, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, comparamos as diferenças de pH, condutividade, O₂ dissolvido, e a concentração de sólidos dissolvidos na água (TDS) entre os tratamentos. As análises foram realizadas no software R, versão 4.3.3 (R Core Team, 2024).

Experimento de exposição crônica

Devido ao baixo número de indivíduos mortos, não analisamos a variação na sobrevivência estatisticamente. Para análise da morfologia geral externa em vista lateral e dorsal, aplicamos inicialmente o método de superimposição de Procrustes utilizando as configurações de *landmarks* (ROHLF, 1990; ZELDITCH *et al.*, 2012). Com esse método é possível visualizar a variação da forma sem considerar os efeitos de tamanho, posição e orientação (MONTEIRO e REIS, 1999; ZELDITCH *et al.*, 2012). Em seguida, utilizamos uma Análise de Componentes Principais (PCA) a partir de uma matriz de variância/covariância das coordenadas de Procrustes para descrever a variação de forma dos girinos nos tratamentos. Posteriormente, aplicamos uma Análise de Variáveis Canônicas (CVA) utilizando as formas médias de todos os girinos para verificar se havia uma ordenação entre os tratamentos. Enquanto a CVA permite uma avaliação mais robusta das variações de forma entre os tratamentos, a PCA é mais adequada para descrever a variação de forma entre indivíduos de um mesmo tratamento (ZELDITCH *et al.*, 2012). Para avaliar as diferenças nas configurações de forma entre os pares de tratamentos, calculamos uma matriz de

distâncias de Procrustes, e por fim, fizemos um teste de permutação (10.000 randomizações) para avaliar a significância estatística entre os tratamentos (KLINGENBERG e MCINTYRE, 1998). Todas as análises morfométricas foram realizadas no software MorphoJ, versão 1.06d (KLINGENBERG, 2011).

Para variáveis comportamentais, utilizamos ANOVA's para analisar a distância total percorrida, a velocidade máxima atingida no 1º estímulo e a média de velocidade máxima. Também por meio de ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, foram analisadas as variáveis pH e O₂ dissolvido. Para TDS e condutividade utilizamos um teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 4.3.3 (R Core Team, 2024).

RESULTADOS

Experimento de exposição aguda

Observamos que houve diferença na sobrevivência dos girinos entre os tratamentos ($H_{(5)} = 22.092$; $p < 0.001$ – Figura 1). A sobrevivência dos girinos no tratamento T5 (100% de mortalidade) diferiu do controle (100% sobrevivência, $p = 0.044$) e dos tratamentos com concentrações mais baixas (T1 - $p = 0.041$ e T2 - $p = 0.0373$), indicando um efeito dose-dependente da contaminação por cobre. Também observamos diferença entre o T2 (100% sobrevivência) e o T4 (100% mortalidade) ($p = 0.048$, Tabela 1). O valor de CL_{50} 96h estimado para girinos de *Boana faber* é 0.134 mg/L.

Observamos que o pH diferiu entre os tratamentos ($F_{(5)} = 3.748$; $p = 0.016$), sendo observada apenas entre o controle e os tratamentos T4 ($p = 0.026$) e T5 ($p = 0.041$) (Tabela S1, Figura 2A). A condutividade também diferiu entre tratamentos ($F_{(5)} = 9.129$; $p < 0.001$), sendo observadas entre o controle e o T2 ($p = 0.015$), o T3 ($p < 0.001$) e o T4 ($p < 0.001$). Além disso, também houve diferença entre o tratamento T1 e T3 ($p = 0.027$) e T1 e T4 ($p = 0.032$) (Tabela S2, Figura 2C). O TDS também diferiu entre os tratamentos ($F_{(5)} = 7.59$; $p < 0.001$), sendo observado entre o controle e os tratamentos T2 ($p = 0.022$), T3 ($p = 0.001$) e T4 ($p < 0.001$) (Tabela S3, Figura 2B). O O₂ dissolvido não apresentou diferença entre os tratamentos ($F_{(5)} = 1.608$, $p = 0,209$) (Figura 2D).

Experimento de exposição crônica

Observamos que no tratamento T2 (40% CL₅₀ 96h), nove dos 50 girinos morreram durante a exposição, enquanto todos do Controle e T1(20% CL₅₀ 96h) sobreviveram. Quanto à variação na morfologia geral externa, observamos alterações na forma dos girinos em vista lateral. As maiores distâncias morfológicas entre as formas médias ocorreram em girinos expostos ao T2 quando comparados à forma média do controle (Tabela 2A, Figura 3A). A visualização das alterações entre as formas médias indicou que as diferenças entre o controle e o tratamento T2 foram observadas principalmente por um corpo levemente mais largo e arredondado, além de maior espessura da musculatura da cauda. Além disso, a cauda apresentou comprimento menor em relação ao corpo, indicando encurtamento quando comparada aos grupos C e T1. Também foram observadas diferenças na posição dos olhos, que no tratamento T2 aparentaram estar localizados em posição mais dorsal (Figura 4).

Em vista dorsal, observamos maior distância morfológica na forma média de girinos expostos ao T1 e T2 quando comparados ao controle (Tabela 2B, Figura 3B). As alterações observadas entre as formas médias indicaram que as diferenças entre o controle e os tratamentos T1 e T2 se apresentaram principalmente com o contorno do corpo mais achatado e uma curvatura na ponta da cauda (Figura 5).

Quanto às análises comportamentais, não observamos diferenças na distância total percorrida pelos girinos ($F_{(2)} = 1.919$, $p = 0.159$), assim como na velocidade máxima no 1º estímulo ($F_{(2)} = 0.061$, $p = 0.941$) e na média de velocidade nos dois estímulos ($F_{(2)} = 0.778$, $p = 0.466$).

Para os parâmetros físico-químicos, observamos que o pH diferiu entre os tratamentos ($F_{(2)} = 21.14$, $p < 0.001$), sendo observada entre o controle e o T1($p = 0.048$), controle e T2 ($p < 0.001$) e T1 e T2 ($p = 0.001$), (Tabela S4, Figura 6A). A condutividade também apresentou diferenças ($H_{(2)} = 17.647$, $p < 0.001$), sendo observadas entre o controle e T1 ($p < 0.001$) e controle e T2 ($p = 0.009$), (Tabela S4, Figura 6C). O TDS também diferiu ($H_{(2)} = 17.494$, $p < 0.001$), sendo observado entre o controle e T1 ($p < 0.001$) e controle e T2 ($p = 0.002$), (Tabela S4, Figura 6B). O O₂ dissolvido não diferiu entre os tratamentos ($F_{(2)} = 3.314$, $p = 0.051$), (Figura 6D).

DISCUSSÃO

Identificamos que a exposição ao cobre resultou na redução da sobrevivência de girinos de *Boana faber*. Quando comparado ao controle (100% de sobrevivência) e aos tratamentos com concentrações mais baixas (T1 e T2), observamos uma redução drástica da sobrevivência nos tratamentos T4 e T5 (ambos com 100% de mortalidade), indicando um efeito dose-dependente. Além disso, o valor de CL₅₀ 96 h estimado para *B. faber* foi de 0,134 mg/L, indicando a sensibilidade da espécie à exposição ao cobre.

A variação na sobrevivência em girinos pode estar relacionada às vias e à capacidade interespecífica de absorção do metal, que ocorrem por diferentes estruturas, sendo as brânquias um dos principais locais de entrada (SCHLENK e ALMEIDA, 2024). Pagenkopf (1983) mostrou que as membranas branquiais de peixes possuem carga negativa devido à presença de fosfolipídios, enquanto os metais em solução possuem cargas positivas, o que favorece a atração dos metais pelas brânquias. Esse mecanismo pode ser estendido aos anfíbios, já que as brânquias dos girinos apresentam funcionamento e composição fisiológica semelhantes, desempenhando papel central na homeostase iônica e na interação com contaminantes presentes na água (MCDONALD *et al.*, 1984; SCHLENK e ALMEIDA, 2024). Uma vez absorvidos, metais como o cobre podem induzir o estresse oxidativo em girinos ao aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando um desequilíbrio nos sistemas antioxidantes das células (FREITAS, 2024). Esse desequilíbrio pode resultar em danos em componentes fisiológicos importantes para a homeostase de girinos, comprometendo funções fisiológicas essenciais e podendo levar à morte celular (WINSTON e DI GIULIO, 1991; CARVALHO *et al.*, 2020).

Trabalhos realizados com outras espécies têm revelado que a sensibilidade dos anfíbios apresenta ampla variação interespecífica. Calfee e Little (2017) observaram que girinos de *Lithobates chiricahuensis* foram menos sensíveis do que *B. faber* quando expostos ao cobre, apresentando um CL₅₀ 96h de 0.22 mg/L. Já em uma revisão realizada por Azizishirazi (2021), foram apresentados valores de CL₅₀ ao cobre para diversas espécies, como *Gastrophryne carolinensis* (CL₅₀ 96h= 40 µg/L; i.e. 0.04 mg/L), *Dryophytes chrysoscelis* (CL₅₀ 96h= 44,7 µg/L; i.e. 0,044 mg/L), *Pelophylax perezii* (CL₅₀ 96h= 970 µg/L; i.e. 0,97 mg/L) e *Duttaphrynus melanostictus* (CL₅₀ 96h= 320 µg/L; i.e. 0,32 mg/L). Para

espécies neotropicais, Franco-de-Sá e Val (2014) observaram um CL_{50} de 23.48 $\mu\text{g/L}$ (i.e. 0.023mg/L) para *Rhinella granulosa* e um $CL_{50} = 36.37 \mu\text{g/L}$ (i.e. 0.036mg/L) para *Scinax ruber*. Essa variação interespecífica na sensibilidade a contaminantes é esperada, uma vez cada espécie responde conforme suas características fisiológicas e ecológicas (COSTA *et al.*, 2024a). Todavia, a comparação desses valores é fundamental, pois viabiliza a construção de curvas de sensibilidade de espécies que permitem identificar padrões de tolerância fundamentais em avaliações de risco ambiental (MAGALHAES e FERRAO-FILHO, 2008; JOHNSON *et al.*, 2016).

A exposição de girinos aos metais pode desencadear efeitos subletais, incluindo alterações no crescimento, desenvolvimento, fisiologia e morfologia (SALLA *et al.*, 2024). Neste estudo, encontramos variações na morfologia geral externa dos girinos, em que detectamos maiores distâncias morfológicas em vista lateral e dorsal em girinos expostos ao cobre quando comparados ao controle. Em comparação, Gürkan e Hayretdağ (2012) observaram efeitos morfológicos em girinos de *Bufo viridis* expostos a concentrações de 0,01 a 0,1 mg/L de sulfato de cobre, como redução do crescimento e do desenvolvimento larval, além de alterações histológicas e prejuízos comportamentais. Em outro estudo, Haywood *et al.*, (2004) observaram efeitos dos metais Zn, Cu, Pb e Cd isoladamente sobre a morfologia de girinos de *Xenopus laevis*. Os resultados indicaram que o cobre em concentrações subletais entre 0,1 mg/L e 0,3mg/L causou uma redução na taxa de crescimento e no tamanho corporal. Em conjunto, esses achados sugerem que a exposição ao cobre pode interferir no desenvolvimento morfológico de girinos mesmo em concentrações subletais, o que pode comprometer processos importantes como crescimento, locomoção e desempenho.

As alterações morfológicas observadas neste estudo estiveram principalmente associadas a curvaturas na cauda, mudanças no contorno corporal e variações na posição dos olhos. Essas alterações envolvem estruturas importantes para o desempenho dos girinos, como a cauda, que exerce um papel fundamental na locomoção, podendo influenciar diretamente sua sobrevivência e desempenho individual (COSTA *et al.*, 2024a). De maneira similar aos nossos achados, estudos com agroquímicos apontam variações diversas na forma dos girinos, como o aumento da profundidade, flexão lateral, torção, rigidez e curvaturas na

cauda de girinos (e.g. KRISHNAMURTHY e SMITH, 2011; ARCAUTE *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2012; KATZENBERGER *et al.*, 2014; SELEEM, 2019). Considerando que essas estruturas morfológicas estão associadas a comportamentos de forrageio e de defesa, alterações morfológicas podem aumentar o risco de predação, afetar a aquisição de alimento e comprometer o potencial competitivo dos girinos (VAN BUSKIRK e RELYEA, 1998; VAN BUSKIRK e MCCOLLUM, 2000; ARENDT, 2009).

Embora alterações morfológicas possam refletir em respostas comportamentais em girinos, nossos resultados indicaram que as concentrações de cobre testadas não ocasionaram nenhum efeito nas variáveis comportamentais testadas em girinos de *B. faber*. Em contraste aos nossos resultados, Araújo *et al.* (2014) observaram que girinos de *Leptodactylus latrans*, *Lithobates catesbeianus* e *Pelophylax perezi* apresentaram comportamento de evitação ao cobre a partir de 100 µg/L (i.e., 0,1 mg/L). Em concentrações mais elevadas, acima de 450 µg/L (i.e., 0,45 mg/L), os autores registraram mortalidade imediata nessas espécies. Em outro estudo, Chen *et al.*, (2007), observaram efeitos no desempenho de natação, além da redução no percentual de indivíduos que conseguiram completar a metamorfose, redução da sobrevivência no período de metamorfose e maior lentidão na reabsorção da cauda em girinos expostos a longo prazo ao tratamento de 100 µg/L de CuSO₄. Já em Zhang *et al.*, (2020) os autores observaram uma redução no desempenho de natação de girinos de *Strauchbufo raddei* expostos naturalmente a um ambiente contaminado com Cu, Zn, Cd, Pb quando comparados a um ambiente livre de contaminação, o que sugere a atuação de efeitos sinérgicos de múltiplos contaminantes. Dessa forma, essa comparação ressalta a importância de considerar as diferentes respostas espécie-específicas, as diferentes concentrações, o tempo de exposição e os distintos contextos ambientais na avaliação da toxicidade de metais em anfíbios.

A força e composição iônica da água pode modular a toxicidade do cobre por meio da competição entre íons dissolvidos e o Cu²⁺ pelos sítios biológicos de absorção e pela alteração de sua especiação química (VÄÄNÄNEN *et al.*, 2018; ADAMS, 2020). Por exemplo, em águas com pH baixo (ácido), a maior concentração de íons H⁺ dificulta a ligação com os íons positivos metálicos, mantendo-os dissolvidos e por sua vez com maior biodisponibilidade (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). Além disso, pH baixo induz a

liberação de metais do sedimento para a coluna d'água (LI *et al.*, 2013). Já em pH alto (básico) há maiores quantidades de OH^- , que se liga aos íons positivos metálicos formando precipitados, reduzindo sua biodisponibilidade (MAGALHÃES *et al.*, 2015). Nossos resultados indicam diferenças estatísticas no pH entre os tratamentos, com valores que variam entre 6,8 e 7,60 na exposição aguda, e 6,85 e 7,44 na exposição crônica. Apesar dessa diferença entre os tratamentos, os valores permaneceram próximos à neutralidade quando comparados aos intervalos que caracterizam condições de pH ácidas ou básicas em ambientes naturais (AFFONSO *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2020; BRASIL, 2021). Além disso, a variação observada não apresentou um padrão consistente de aumento ou diminuição em função das concentrações de cobre testadas. Dessa forma, embora o pH tenha apresentado variação entre os tratamentos, é pouco provável que esse parâmetro, isoladamente, explique os efeitos biológicos observados.

Outros parâmetros que refletem indiretamente a força iônica são o total de sólidos dissolvidos (TDS) e a condutividade. No entanto, estudos experimentais demonstram que a toxicidade do cobre não depende de valores absolutos de TDS, mas principalmente da identidade e da concentração dos íons que compõem essa fração dissolvida (ERICKSON *et al.*, 1996). Canli (2015) observou que peixes expostos ao cobre em águas de condutividade mais baixa ($\sim 77 \mu\text{S}/\text{cm}$) resultaram em maiores efeitos tóxicos, indicando que ambientes com menor carga iônica tendem a aumentar a toxicidade do metal. Em nossos resultados, os valores de condutividade variaram entre $\sim 100,5 \mu\text{S}/\text{cm}$ e $\sim 118,5 \mu\text{S}/\text{cm}$, sendo maiores nos tratamentos com maiores concentrações em relação ao controle em ambas as exposições. Desta forma, com essa variação estreita nos valores de condutividade e a ausência de dados detalhados sobre a composição iônica da água, nossos resultados sugerem que as variações nesses parâmetros não determinaram a biodisponibilidade e a toxicidade do cobre nos girinos. De forma semelhante, o oxigênio dissolvido (OD) também pode alterar o potencial redox do ambiente e consequentemente a biodisponibilidade dos metais (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). Estudos demonstraram que em ambientes aeróbicos, os níveis altos de OD podem ter influência na taxa de oxidação dos metais ligados à matéria orgânica, aumentando assim a liberação de metais ligados ao sedimento (LI *et al.*, 2013). Por outro lado, em ambientes anóxicos os níveis mais baixos de OD podem facilitar a adsorção dos metais ao sedimento (KANG *et al.*, 2019). Em nossos resultados, além de não apresentar diferenças

estatísticas entre os tratamentos, os níveis de OD encontrados variaram entre 3 e 4 mg/L. Esses valores baixos indicam que o OD provavelmente não causou efeitos determinantes na variação da biodisponibilidade do cobre no experimento.

Numa perspectiva geral, o valor da CL₅₀ 96h e os efeitos subletais observados neste estudo contribuem para o preenchimento de uma lacuna sobre os efeitos do cobre em anfíbios neotropicais. *Boana faber* é um hilídeo comum, amplamente distribuído e classificado como Pouco Preocupante (IUCN, 2025), sendo reconhecido por sua tolerância a diferentes condições ambientais (FROST, 2026). Nesse contexto, nossos resultados fornecem informações que podem contribuir para a comparação dos valores de sensibilidade entre diferentes espécies em curvas de sensibilidade, podendo ser utilizadas como referência para estimar potenciais efeitos em outros hilídeos neotropicais, particularmente espécies do gênero *Boana*. Além disso, as diretrizes brasileiras de qualidade da água, como a Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005), são baseadas em dados ecotoxicológicos obtidos a partir de organismos-padrão internacionalmente aceitos, como microcrustáceos e peixes (PASSOS *et al.*, 2018). Essa abordagem pode resultar em critérios pouco representativos para a fauna aquática nativa. Desta forma, os resultados do presente estudo fornecem informações de sensibilidade de uma espécie nativa brasileira, que pode contribuir para a identificação de padrões de tolerância de espécies nativas em avaliações de risco ambiental.

Nossos resultados abordaram os efeitos isolados do cobre sobre girinos. Contudo, em ambientes naturais, a biodisponibilidade dos metais depende da composição físico-química da água (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024), bem como da interação com outros fatores abióticos presentes nesses ecossistemas, como a temperatura, que pode modular a toxicidade dos contaminantes sobre os anfíbios (FRANCO-DE-SÁ e VAL, 2014; COSTA *et al.*, 2024b). Nesse sentido, os dados aqui apresentados constituem uma base para estudos futuros que incorporem múltiplos estressores, contribuindo para uma compreensão mais realista das respostas dos anfíbios em ambientes naturais.

Agradecimentos

Agradecemos ao Museu de Zoologia Newton Baião de Azevedo (MZNB) da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) por ceder o laboratório para a realização

dos experimentos. Aos professores Me. Ériton Luis Santolin e Dr. Rafael Almeida de Freitas pela ajuda com os cálculos das concentrações dos metais. Ao professor Dr. Alessandro Marques de Oliveira pela ajuda com as análises morfométricas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. et al. **Bioavailability assessment of metals in freshwater environments: A historical review**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2020, v. 39, n. 1, p. 48–59.

AFFONSO, A. G.; QUEIROZ, H. L.; NOVO, E. M. L. M. **Abiotic variability among different aquatic systems of the central Amazon floodplain during drought and flood events**. Brazilian Journal of Biology, 2015, v. 75, n. 4 Supl 1, p. 60-69.

AIGBERUA, A. O.; TARAWOU, J. T.; ABASI, C. Y. **Effect of oxidation-reduction fluctuations on metal mobility of speciated metals and arsenic in bottom sediments of Middleton River, Bayelsa State, Nigeria**. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 2018, v. 22, n. 9, p. 1511–1517.

ALLENTOFT, M. E.; O'BRIEN, J. **Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review**. Diversity. 2010, v. 2, n. 1, p. 47-71.

AMOATEY, P.; BAAWAIN, M. S. **Effects of pollution on freshwater aquatic organisms**. Water Environment Research, 2019, v. 91, n. 10, p. 1272–1287.

ARAÚJO, C. VM et al. **Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles**. Toxicologia aquática, 2014v. 146, p. 70-75.

ARCAUTE, C. R. et al. **Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban 48E formulation of chlorpyrifos**. Ecotoxicology, 2012, v. 21, n. 8, p. 2338-2348.

ARENDT, J. **Morphological Correlates of Sprint Swimming Speed in Five Species of Spadefoot Toad Tadpoles: Comparison of Morphometric Methods**. Journal of Morphology, 2010, v. 271, n. 9, p. 1044-1052.

ARENDT, J. D. **Influence of sprint speed and body size on predator avoidance in New Mexican spadefoot toads (*Spea multiplicata*)**. Oecologia, 2009, v. 159, n. 2, p. 455-461.

AZIZISHIRAZI, A.; KLEMISH, J. L.; PYLE, G. G. **Sensitivity of amphibians to copper**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2021, v. 40, n. 7, p. 1808-1819.

BABY, J. et al. **Toxic effect of heavy metals on aquatic environment**. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2010, v. 4, n. 4.

BAKER, N. J.; BANCROFT, B. A.; GARCIA, T. S. **A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians**. Science of the Total

Environment, 2013, v. 449, p. 150–156.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: https://conama.mma.gov.br/?id=450&option=com_sisconama&task=arquivo.download. Acesso em: 23/12/25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 maio 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>. Acesso em: 23/12/2025.

CALFEE, R. D.; LITTLE, E. E. **Toxicity of cadmium, copper, and zinc to the threatened Chiricahua leopard frog (*Lithobates chiricahuensis*)**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, v. 99, n. 6, p. 679–683.

CANLI, E. G.; CANLI, M. **Low Water Conductivity Increases the Effects of Copper on the Serum Parameters in Fish (*Oreochromis niloticus*)**. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, v. 39, n. 2, p. 606-613.

CARVALHO, C. S. et al. **Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, v. 196, p. 110560.

CARVALHO, C. S.; PINTO-VIDAL, F. A. Ecotoxicological impacts of metals on amphibian tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 13, p. 270–302.

CEBALLOS, G.; EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. **Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, v. 117, n. 24, p. 13596–13602.

CHAI, L. et al. **Chronic exposure effects of copper on growth, metamorphosis and thyroid gland, liver health in Chinese toad, *Bufo gargarizans* tadpoles**. Chemistry and Ecology, 2014, v. 30, n. 7, p. 589-601.

CHEN, Te-Hao; GROSS, J. A.; KARASOV, W. H. **Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*)**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, v. 26, n. 7, p. 1470–1475.

COSTA, A. G.; BORGES, Á. M.; SOTO-BLANCO, B. **Metais tóxicos e seus efeitos sobre a reprodução dos animais**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 2020, v. 14, n. 1, p. 108–124.

COSTA, R. N. et al. How pollutants are affecting amphibian tadpoles: relationship with anthropogenic pollutants and perspectives for the future. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024a. cap. 1, p. 1–26.

COSTA, R. N. et al. Pesticide Effects on Growth and External Morphology of Larvae and Metamorphs (Amphibia, Anura), Evidence From Experimental Studies. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024b. cap. 12, p. 218–269.

DAVID, M. et al. **Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799)**. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2012, v. 103, n. 2, p. 127-134.

DUBEUX, M. J. M. et al. **Morphological characterization and taxonomic key of tadpoles (Amphibia: Anura) from the northern region of the Atlantic Forest**. Biota Neotropica, 2020, v. 20, n. 2, p. e20180718.

ERICKSON, R. J. et al. **The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows**. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, v. 15, n. 2, p. 181-193.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA C. L. N. **Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax***. Journal of Integrated Coastal Zone Management, 2010, v. 10, n. 2, p. 229–241.

FRANCO-DE-SÁ, J. F. O.; VAL, A. L. **Copper toxicity for *Scinax ruber* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura) of the Amazon: Potential of Biotic Ligand Model to predict toxicity in urban streams**. Acta Amazônica, 2014, v. 44, p. 491-498.

FREITAS, C. M.; SILVA, M. A.; MENEZES, F. C. **O desastre na barragem de mineração da Samarco: fratura exposta dos limites do Brasil na redução de risco de desastres**. Ciência e Cultura, 2016, v. 68, n. 3, p. 25-30.

FREITAS, J. S. Pollutants and Oxidative Stress in Tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 6, p. 111-132.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.1. Nova York: American Museum of Natural History, 2026. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org>. Acesso em: 08/01/2026.

GALLANT, A. L. et al. **Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation**. Copeia, v. 2007, n. 4, p. 967–979.

GARCÍA-MUÑOZ, E.; GUERRERO, F.; PARRA, G. **Effects of copper sulfate on growth, development and escape behavior**. Archives of Environmental Contamination

and Toxicology, 2009, v. 56, n. 3, p. 557–565.

GHOSE, S. L. et al. **Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2014, v. 33, n. 9, p. 2114–2119.

GIROTTI, L. et al. **Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the dam rupture in Mariana, MG (Brazil)**. Water, Air, & Soil Pollution, 2020, v. 231, n. 7, p. 325.

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

GUEZGOUZ, N. et al. **Heavy Metals Assessment in the Medjerda River Basin (Northeastern Algeria): A Preliminary Water Analysis and Toad Skin Biopsy**. Proceedings of the Zoological Society, 2021, p. 104-113.

GÜRKAN, M.; HAYRETDAG, S. **Morphological and histological effects of copper sulfate on the larval development of green toad, *Bufo viridis***. Turk J Zool, 2012, v. 36, n. 2, p. 231-240.

HAYWOOD, L. K. et al. ***Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium**. African Zoology, 2004, v. 39, n. 2, p. 163-174.

HOSSAIN, M.; RAKKIBU, Md G. **Effects of copper on aquatic ecosystems-A review**. Khulna University Studies, 1999, p. 259-266.

IBAMA. **Laudo técnico preliminar: impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais**. Brasília, DF: Ibama, 2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf. Acesso em: 23/10/2025

ILIĆ, M. et al. **Geometric vs. traditional morphometric methods for exploring morphological variation of tadpoles at early developmental stages**. Amphibia-Reptilia, 2019, v. 40, n. 4, p. 499-509.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2025-2. Gland, Suíça: IUCN, 2025. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 24/10/2025.

IUCN SSC AMPHIBIAN SPECIALIST GROUP. **State of the World's Amphibians: the second global amphibian assessment**. [Texas, EUA]: Re:wild; Gland, Suíça: IUCN, 2023. Disponível em: <https://www.iucn-amphibians.org/state-of-the-worlds-amphibians/> Acesso em: 24/10/2025.

JOHNSON, M. S. et al. **A Review of Ecological Risk Assessment Methods for Amphibians: Comparative Assessment of Testing Methodologies and Available Data.** Integrated environmental assessment and management, 2016, v. 13, n. 4, p. 601-613.

KANG, Mengxin et al. **Effect of dissolved oxygen and nutrient levels on heavy metal contents and fractions in river surface sediments.** Science of the total environment, 2019, v. 648, p. 861-870.

KATZENBERGER, M. et al. **Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles.** PloS one, 2014, v. 9, n. 5, p. e98265.

KELEPERTZIS, E. et al. **Distribution and Accumulation of Metals in Tadpoles Inhabiting the Metalliferous Streams of Eastern Chalkidiki, Northeast Greece.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, v. 63, n. 3, p. 409–420.

KLINGENBERG, C. P. **MorphoJ: na integrated software package for geometric morphometrics.** Molecular Ecology Resources, 2011, v. 11, n. 2, p. 353-357.

KLINGENBERG, C. P.; MCINTYRE, G. S. **Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods.** Evolution, 1998, v. 52, n. 5, p. 1363-1375.

KRISHNAMURTHY, S. V.; SMITH, G. R. **Combined effects of malathion and nitrate on early growth, abnormalities, and mortality of wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles.** Ecotoxicology, 2011, v. 20, n. 6, p. 1361-1367.

LANCE, S. L. et al. **Within- and among-population level differences in response to chronic copper exposure in southern toads, *Anaxyrus terrestris*.** Environmental Pollution, 2013, v. 177, p. 135-142.

LI, H. et al. **Effect of pH, Temperature, Dissolved Oxygen, and Flow Rate of Overlying Water on Heavy Metals Release from Storm Sewer Sediments.** Journal of Chemistry , 2013, n. 1, p. 434012.

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

MAGALHAES, D. P.; FERRAO-FILHO, A. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** Oecologia brasiliensis, 2008, v. 12, n. 3, p. 3.

MAGALHÃES, D. P. et al. **Metal bioavailability and toxicity in freshwaters.** Environmental chemistry letters, 2015, v. 13, n. 1, p. 69-87.

MARQUES, N. S.; NOMURA, F. **Where to Live? How Morphology and Evolutionary History Predict Microhabitat Choice by Tropical Tadpoles.** Biotropica, 2015, v. 47, n.

2, p. 227-235.

MARTINS, M.; HADDAD, C. F.B. **Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae).** Amphibia-reptilia, 1988.

MCDONALD, D. G.; OZOG, J. L.; SIMONS, B. P. **The influence of low pH environments on ion regulation in the larval stages of the anuran amphibian, *Rana clamitans*.** Canadian Journal of Zoology, 1984, v. 62, n. 11, p. 2171-2177.

MISHRA, V. K. et al. **Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent.** Monitoramento e Avaliação Ambiental, 2008, v. 141, n. 1, p. 49-58.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica.** 1999. p. 189-189.

NATIONS, S. et al. **Subchronic and chronic developmental effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on *Xenopus laevis*.** Chemosphere, 2015, v. 135, p. 166-174.

PAGENKOPF, G. K. **Gill Surface Interaction Model for Trace-Metal Toxicity to Fishes: Role of Complexation, pH, and Water Hardness.** Environmental Science e Technology, 1983, v. 17, n. 6, p. 342-347.

PASSOS, A. L. L.; MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA FILHO, E. C. **CrITÉrios para Avaliação da Qualidade de ÁguA no Brasil: Um Questionamento sobre os Parâmetros Utilizados.** Fronteira: Journal of Social, Technological and Environmental Science, 2018, v. 7, n. 2, p. 290-303.

PEJMAN, A. et al. **Fractionation of heavy metals in sediments and assessment of their availability risk: A case study in the northwestern of Persian Gulf.** Marine Pollution Bulletin, 2016, v. 114, p. 881–887.

PELES, John D. **Effects of chronic aluminum and copper exposure on growth and development of wood frog (*Rana sylvatica*) larvae.** Aquatic Toxicology, 2013, v. 140, p. 242-248.

PELTZER, Paola M. et al. **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, 2013, v. 98, p. 142-151.

PESCE, S. et al. **The use of copper as plant protection product contributes to environmental contamination and resulting impacts on terrestrial and aquatic biodiversity and ecosystem functions.** Environmental Science and Pollution Research, 2025, v. 32, n. 6, p. 2830–2846.

PILLAY, R. et al. **Tropical forests harbor more than half of the world's vertebrate**

species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2022, v. 20, n. 1, p. 10–15.

R CORE TEAM. 2024. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 22/12/2025

ROHLF, F. James. **Morphometries.** *Annual Review of ecology and Systematics*, 1990, p. 299-316.

RUMRILL, C. T.; SCOTT, D. E.; LANCE, S. L. **Effects of metal and predator stressors in larval southern toads (*Anaxyrus terrestris*).** 2016, v. 25, n. 6, p. 1278-1286.

RUTHSATZ, K.; GLOS, J. Effects of pollutants on the endocrine system of tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles.** Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 5, p. 78–110.

SALLA R. F. et al. Developmental Abnormalities in Tadpoles as Biomarkers to Assess the Ecotoxicity of Traditional and Emerging Pollutants. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles.** Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 14, p. 303–326.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. **Biogeographic Biases in Research and Their Consequences for Linking Amphibian Declines to Pollution.** *Conservation Biology*, 2007, v. 21, p. 465–471.

SCHLENK, D.; ALMEIDA, A. Toxicokinetic Pathways of Environmental Contaminants in Amphibian Tadpoles In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles.** Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 3, p. 36–62.

SELEEM, A. A. **Teratogenicity and neurotoxicity effects induced by methomyl insecticide on the developmental stages of *Bufo arabicus*.** *Neurotoxicology and Teratology*, 2019, v. 72, p. 1-9.

SHERRATT, E.; MARION A.; SCOTT K. J. **Ecomorphological diversity of Australian tadpoles.** *Ecology and evolution*, 2018, v. 8, n. 24, p. 12929-12939.

SMRITI, A. A.; LODHI, S.; SHUKLA, S. **Copper toxicity in aquatic ecosystem: A Review.** *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2023, v. 11, n. 4, p. 134-138.

STANKOVIC, S.; KALABA, P.; STANKOVIC, A. R. **Biota as toxic metal indicators.** *Environmental Chemistry Letters*, 2014, v. 12, p. 63–84.

VÄÄNÄNEN, K. et al. **Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems: From science to environmental management.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, v. 147, p. 430–446.

VAN BUSKIRK, J.; RELYEA, R. A. **Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles.** Biological Journal of the Linnean Society, 1998, v. 65, n. 3, p. 301-328.

VAN BUSKIRK, J. **Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature?** Ecological Monographs, 2009, v. 79, n. 4, p. 681-705.

VAN BUSKIRK, J.; MCCOLLUM, S. A. **Influence of tail shape on tadpole swimming performance.** Journal of Experimental Biology, 2000, v. 203, n. 14, p. 2149-2158.

VIEIRA, I. F. B. et al. **Water security assessment of groundwater quality in an anthropized rural area from the Atlantic forest biome in Brazil.** Water, 2020, v. 12, n. 3, p. 623.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. **Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms.** Aquatic toxicology. 1991, v. 19, n. 2, p. 137-161.

ZELDITCH, M.; SWIDERSKI, D.; SHEETS, H. D. **Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer: An Introduction.** Academic Press, 2012.

ZHANG, W.; ZHI, H.; SUN, H. **Effects of Heavy Metal Pollution on Fitness and Swimming Performance of *Bufo raddei* Tadpole.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2020, v. 105, n. 3, p. 387-392.

Figuras e Tabelas

Figura 1 - Número de girinos sobreviventes nas diferentes concentrações de cobre testadas. As barras centrais representam a mediana da distribuição do grupo, os limites das caixas correspondem aos quartis Q1 e Q3, e os bigodes indicam a variação dos dados até 1,5 vezes o intervalo interquartil.

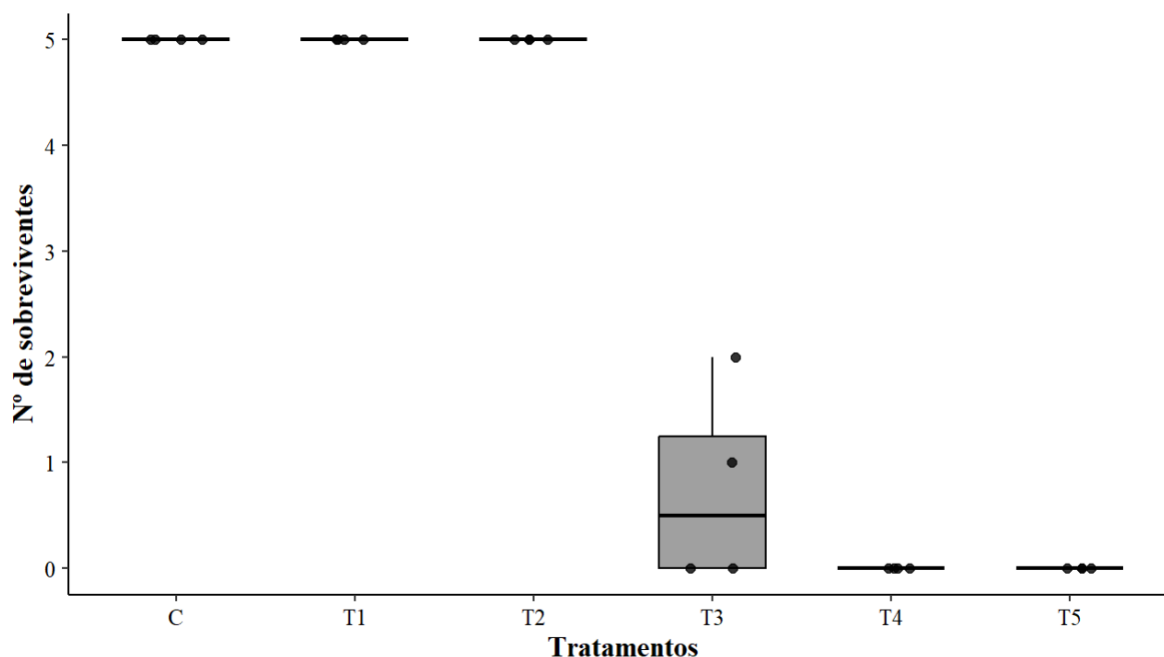


Figura 2 –Parâmetros físico-químicos da água nos diferentes tratamentos (experimento de exposição aguda). As barras centrais representam a mediana da distribuição do grupo, os limites das caixas correspondem aos quartis Q1 e Q3, e os bigodes indicam a variação dos dados até 1,5 vezes o intervalo interquartil. (A) pH, (B) TDS, (C) condutividade e (D) O₂ dissolvido. Os grupos que apresentaram diferença em relação ao controle estão destacados com (*).

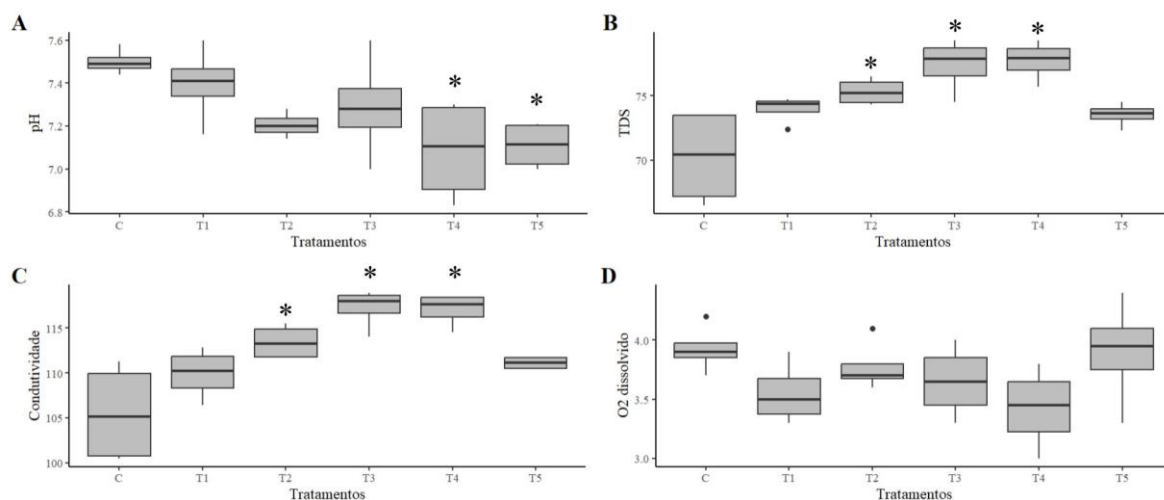


Tabela 1 - Comparações par-a-par para sobrevivência entre os tratamentos com p-valores ajustados, obtidas pelo teste de Dunn.

	C	T1	T2	T3	T4	T5
C	-	-	-	-	-	-
T1	1.000	-	-	-	-	-
T2	1.000	1.000	-	-	-	-
T3	0.231	0.205	0.179	-	-	-
T4	0.056	0.052	0.048	1.000	-	-
T5	0.044	0.041	0.037	1.000	1.000	-

Figura 3 - Diferenças nas formas médias dos girinos expostos aos tratamentos. (A) vista lateral, (B) vista dorsal.

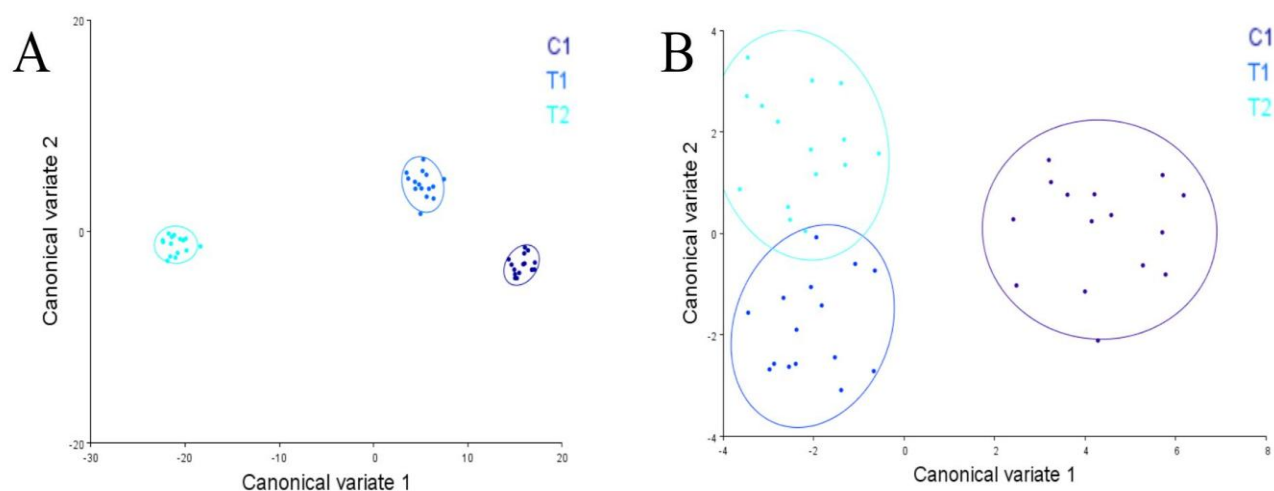


Tabela 2 - Valores de distância de Procrustes e p-valor da CVA para os tratamentos na análise morfológica. (A) em vista lateral e (B) em vista dorsal (os p-valores significativos estão destacados em negrito).

	A- Vista lateral		B- Vista dorsal	
	Distância	de p-valor	Distância	de p-valor
	Procrustes		Procrustes	
C x T1	0,0194	0,205	0,0267	0,013
C x T2	0,0341	0,001	0,0311	0,014
T1 x T2	0,0243	0,057	0,0174	0,273

Figura 4 - Grade de transformação e wireframe das mudanças gerais e alterações dentro de cada grupo na morfologia geral externa dos girinos em vista lateral. A grade de transformação e wireframe mostram o movimento dos landmarks e a distorção causada por esse movimento. Em azul claro no wireframe, mostra o consenso da forma (forma média do grupo) e em azul escuro, mostra a forma predita no extremo do eixo PC1 (que explica maior parte da variação dentro do grupo).

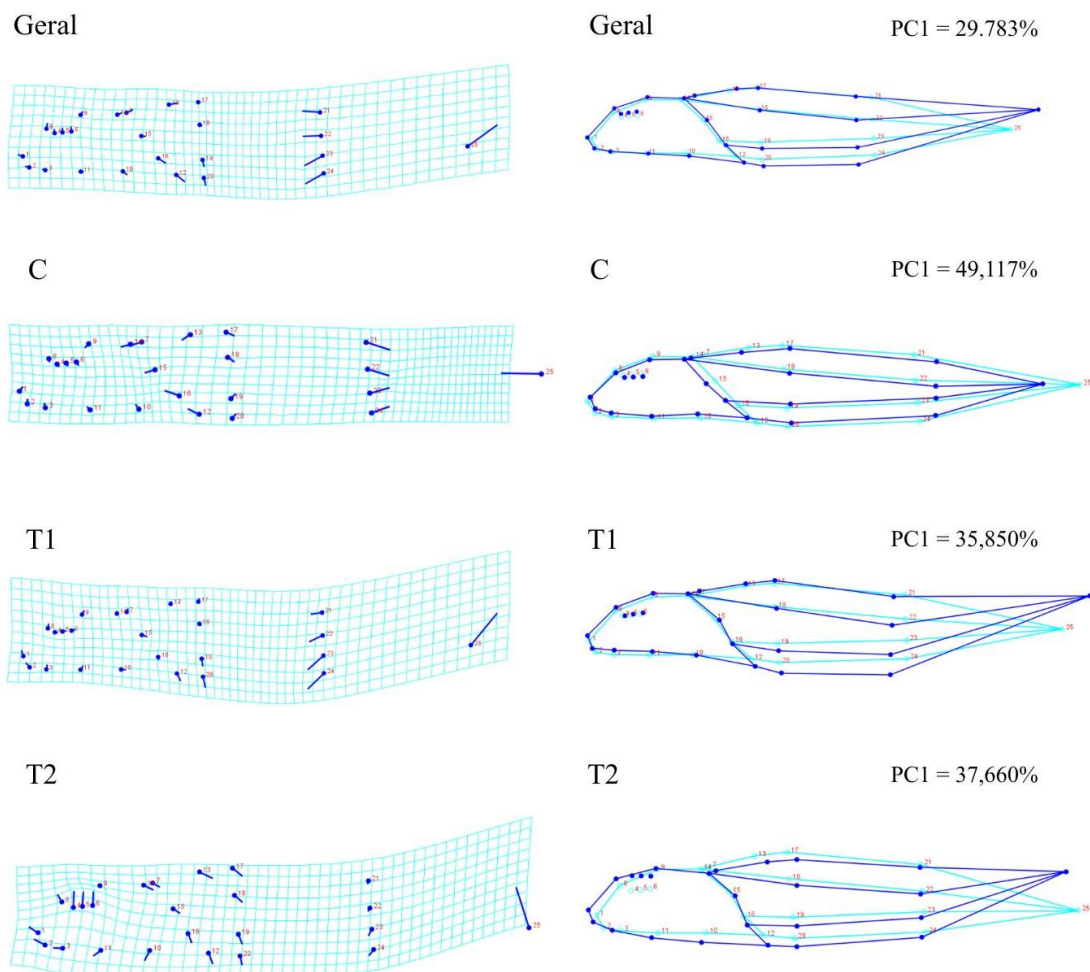


Figura 5 - Grade de transformação e wireframe das mudanças gerais e dentro de cada grupo na morfologia geral externa dos girinos em vista dorsal. A grade de transformação e wireframe mostram o movimento dos landmarks e a distorção causada por esse movimento. Em azul claro no wireframe, mostra o consenso da forma (forma média do grupo) e em azul escuro, mostra a forma predita no extremo do eixo PC1 (que explica maior parte da variação dentro do grupo).

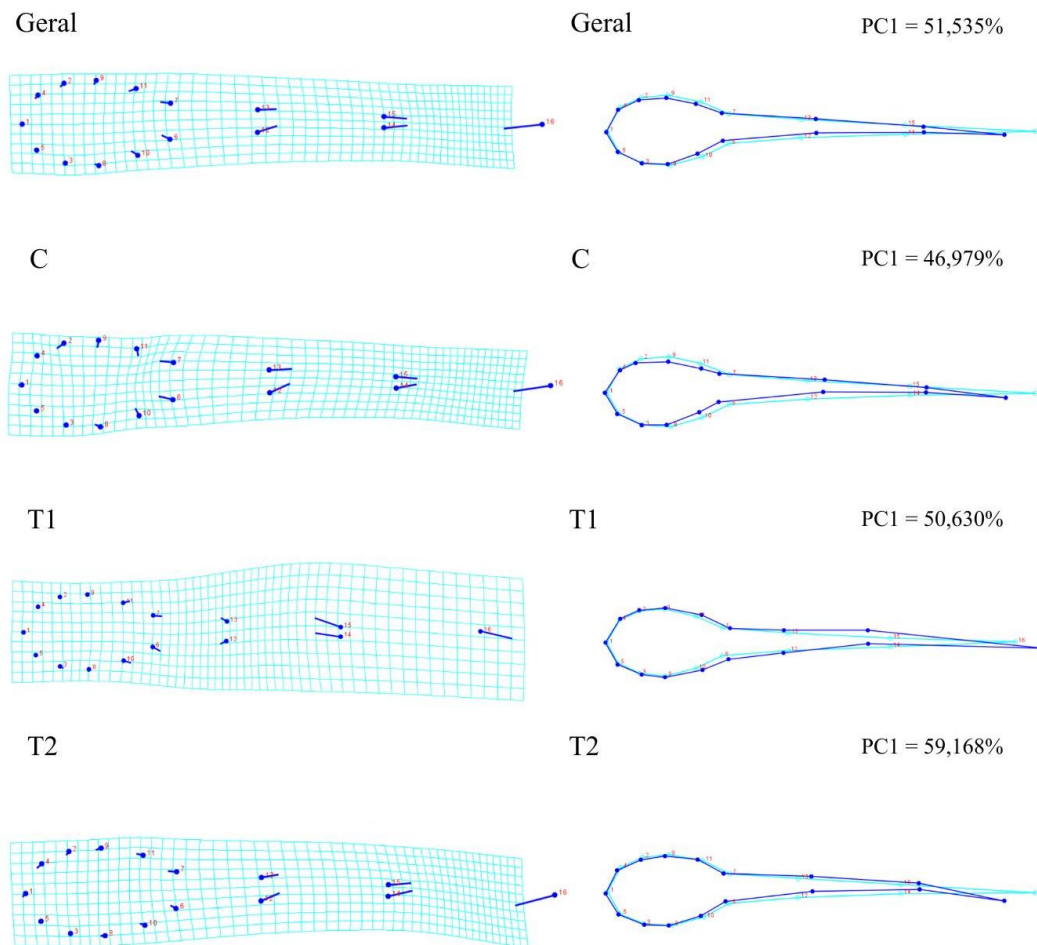
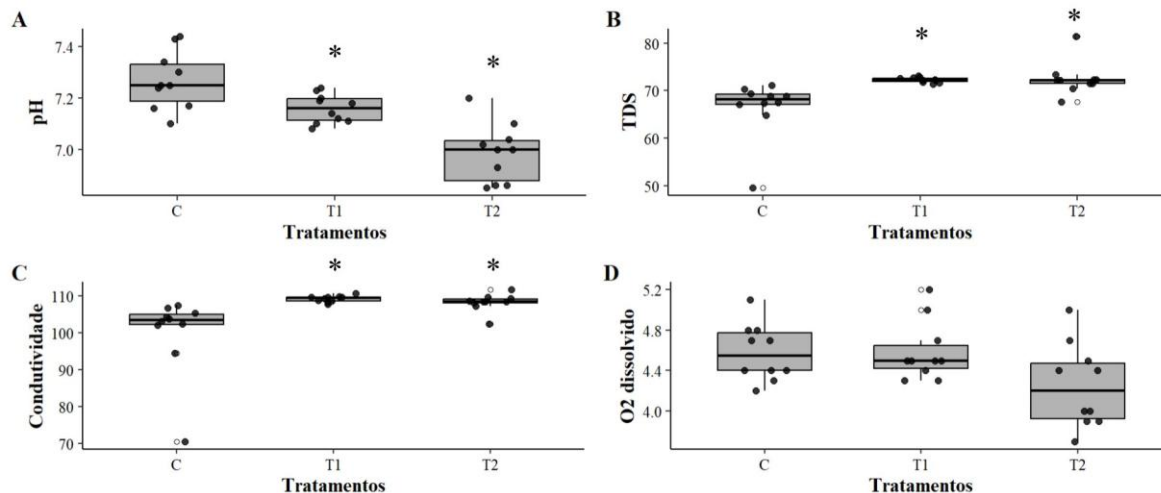


Figura 6 - Parâmetros físico-químicos da água nos diferentes tratamentos (experimento de exposição crônica). As barras centrais representam a mediana da distribuição do grupo, os limites das caixas correspondem aos quartis Q1 e Q3, e os bigodes indicam a variação dos dados até 1,5 vezes o intervalo interquartil. (A) pH, (B) TDS, (C) condutividade e (D) O₂ dissolvido. Os grupos que apresentaram diferença em relação ao controle estão destacados com (*).



Material suplementar

Tabela S1 – Comparações par-a-par do teste de Tukey para o pH da água entre os tratamentos experimentais na exposição aguda. Os p-valores significativos estão destacados em negrito.

	C	T1	T2	T3	T4	T5
C	-	-	-	-	-	-
T1	0.9460397	-	-	-	-	-
T2	0.1824082	0.6111013	-	-	-	-
T3	0.5107340	0.9460397	0.9777069	-	-	-
T4	0.0268767	0.1468055	0.9092430	0.5355458	-	-
T5	0.0411202	0.2097821	0.9642050	0.6613823	0.9999326	-

Tabela S2 - Comparações par-a-par do teste de Tukey para a condutividade da água entre os tratamentos experimentais na exposição aguda. Os p-valores significativos estão destacados em negrito.

	C	T1	T2	T3	T4	T5
C	-	-	-	-	-	-
T1	0.3404323	-	-	-	-	-
T2	0.0154681	0.5637770	-	-	-	-

T3	0.0003476	0.0272044	0.4866287	-	-	-
T4	0.0004126	0.0322250	0.5354140	0.9999993	-	-
T5	0.1328227	0.9910117	0.8779382	0.0858540	0.1002917	-

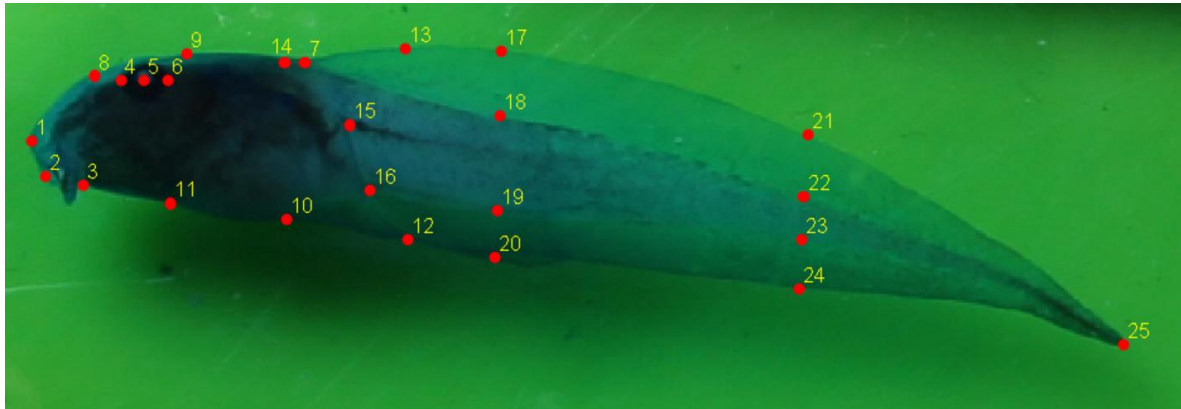
Tabela S3 - Comparações par-a-par do teste de Tukey para o TDS da água entre os tratamentos experimentais na exposição aguda. Os p-valores significativos estão destacados em negrito.

	C	T1	T2	T3	T4	T5
C	-	-	-	-	-	-
T1	0.1438959	-	-	-	-	-
T2	0.0229361	0.9282696	-	-	-	-
T3	0.0010658	0.2061117	0.6938245	-	-	-
T4	0.0006611	0.1395026	0.5575691	0.9998985	-	-
T5	0.2375798	0.9996220	0.8087504	0.1230467	0.0806202	-

Tabela S4 – Comparações par-a-par dos testes a post-hoc das análises dos parâmetros físico-químicos da água na exposição crônica. Os valores significativos estão destacados em negrito.

pH			
	C	T1	T2
C	-	-	-
T1	0.048	-	-
T2	<0.001	0.001	-
Condutividade			
	C	T1	T2
C	-	-	-
T1	<0.001	-	-
T2	0.009	0.790	-
TDS			
	C	T1	T2
T1	-	-	-
T2	<0.001	-	-
	0.002	1.000	-

Figura S1 – Posição dos *landmarks* em vista lateral em girinos de *Boana faber*

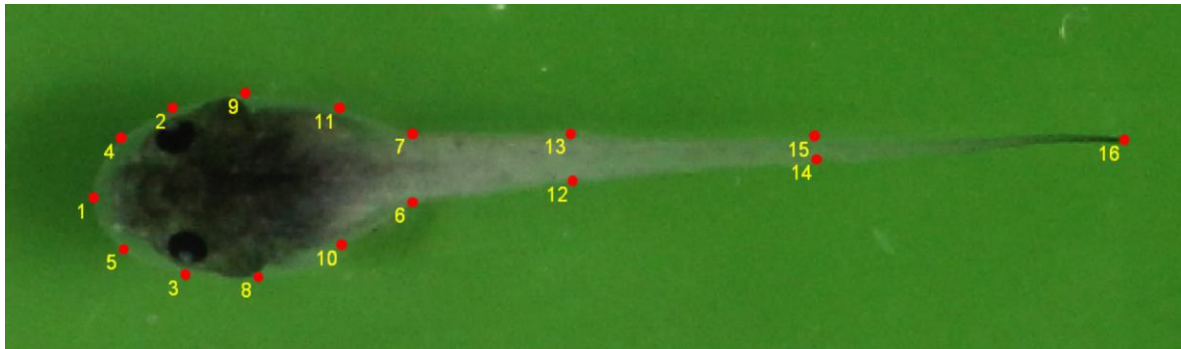


Descrição dos *landmarks* em vista lateral em girinos de *Boana faber*:

1. Extremidade anterior do focinho.
2. Ponto anterior do tubo oral visto de perfil.
3. Ponto posterior do tubo oral visto de perfil.
4. Borda anterior da íris, localizada em uma linha horizontal que passa pelo centro do olho.
5. Centro da pupila.
6. Borda posterior da íris, localizada em uma linha horizontal que passa pelo centro do olho.
7. Ponto onde a nadadeira caudal dorsal se une à parte superior do corpo.
8. Borda dorsal do corpo, situada a 1/3 da distância entre os landmarks 1 e 7.
9. Borda dorsal do corpo, situada a 2/3 da distância entre os landmarks 1 e 7.
10. Interseção entre o ponto terminal do corpo e a extremidade anterior do tubo anal.
11. Borda ventral do corpo, situada no ponto médio entre os landmarks 3 e 10.
12. Extremidade posterior do tubo anal.
13. Borda dorsal da nadadeira caudal diretamente acima do landmark 12.
14. Interseção entre a borda dorsal do músculo caudal e o corpo.
15. Interseção entre a notocorda e o corpo.
16. Interseção entre a borda ventral do músculo caudal e o corpo.
17. Ponto mais alto da borda dorsal da nadadeira caudal.
18. Borda dorsal do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 17.

19. Borda ventral do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 17.
20. Borda ventral da nadadeira caudal, diretamente abaixo do landmark 17.
21. Borda dorsal da nadadeira caudal localizada no ponto médio entre os landmarks 17 e 25.
22. Borda dorsal do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 21.
23. Borda ventral do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 21.
24. Borda ventral da nadadeira caudal, diretamente abaixo do landmark 21.
25. Extremidade da cauda.

Figura S2 – Posição dos *landmarks* em vista dorsal em girinos de *Boana faber*



Descrição dos *landmarks* em vista dorsal em girinos de *Boana faber*:

1. Extremidade mais anterior do focinho.
2. Borda externa do olho direito, na região medial do olho .
3. Borda externa do olho esquerdo, na região medial do olho .
4. Ponto central entre os landmarks 1 e 2, representando a curvatura do focinho.
5. Extremidade esquerda do focinho, localizada diretamente acima do landmark 4, representando a curvatura do focinho.
6. Ponto de encontro entre a extremidade esquerda do músculo caudal e o corpo.
7. Ponto de encontro entre a extremidade direita do músculo caudal e o corpo.
8. Borda do lado esquerdo do corpo, situada a 1/3 da distância entre os landmarks 3 e 6, representando a curvatura do corpo.
9. Borda do lado direito do corpo, situada a 1/3 da distância entre os landmarks 2 e 7, representando a curvatura do corpo.

10. Borda do lado esquerdo do corpo, situada a $\frac{2}{3}$ da distância entre os landmarks 3 e 6, representando a curvatura do corpo
11. Borda do lado direito do corpo, situada a $\frac{2}{3}$ da distância entre os landmarks 2 e 7, representando a curvatura do corpo.
12. Borda do músculo caudal no lado esquerdo do corpo, situada a $\frac{1}{3}$ da distância entre os landmarks 6 e 16.
13. Borda do músculo caudal no lado direito do corpo, situada a $\frac{1}{3}$ da distância entre os landmarks 7 e 16.
14. Borda do músculo caudal no lado esquerdo do corpo, situada a $\frac{2}{3}$ da distância entre os landmarks 6 e 16.
15. Borda do músculo caudal no lado direito do corpo, situada a $\frac{2}{3}$ da distância entre os landmarks 7 e 16.
16. Extremidade da cauda

CAPÍTULO 2

Efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em diferentes cenários de temperatura em girinos de *Scinax fuscovarius* (Anura: Hylidae)

Dinalmo Ferreira Botelho Vieira, Stephano Moraes Almeida, Sthefany dos Santos Souza, Alexandre Schiavetti, Mirco Solé, Renan Nunes Costa.



Fonte: Dubeux et al. 2020

Manuscrito a ser submetido a revista *Environmental Toxicology*

Efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em diferentes cenários de temperatura em girinos de *Scinax fuscovarius* (Anura: Hylidae)

Dinalmo Ferreira Botelho vieira¹, Stephano Moraes Almeida², Sthefany dos Santos Souza², Alexandre Schiavetti¹, Mirco Solé¹, Renan Nunes Costa².

1 - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

2 - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade Carangola, Praça dos Estudantes, nº 23, Bairro Santa Emília, Carangola, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

Os metais ocorrem naturalmente em ecossistemas aquáticos, porém atividades antrópicas, como agricultura e mineração, têm intensificado sua liberação nesses ambientes. O cobre é um micronutriente essencial, mas, em concentrações elevadas, pode exercer efeitos tóxicos e comprometer a homeostase dos organismos expostos, especialmente os anfíbios, cujos estágios larvais apresentam elevada capacidade de absorção e bioacumulação de contaminantes por meio das brânquias, pele e trato gastrointestinal. Paralelamente, o aumento da temperatura global pode modular a toxicidade dos metais, potencialmente resultando em efeitos aditivos ou sinérgicos. Neste estudo, avaliamos experimentalmente os efeitos letais e subletais da contaminação por sulfato de cobre (CuSO₄) sob dois cenários térmicos (25 °C e 30 °C) em girinos da espécie *Scinax fuscovarius*. A toxicidade aguda foi avaliada por meio de um experimento fatorial combinando concentrações crescentes de cobre e temperatura, no qual avaliamos a sobrevivência para estimar a concentração letal média (CL₅₀ 96h). Para a avaliação de efeitos subletais, conduzimos um experimento crônico de 14 dias, combinando temperatura e uma concentração subletal de cobre (20% da CL₅₀), no qual foram analisados parâmetros comportamentais de natação e alterações na morfologia geral externa por meio de técnicas de morfometria geométrica. A sobrevivência diferiu significativamente entre os tratamentos, com mortalidade total observada na maior concentração de cobre, independentemente do cenário térmico. O aumento da temperatura não alterou a toxicidade do cobre, e a CL₅₀ 96h estimada foi de 0,235 mg/L na temperatura ambiente e 0,236 mg/L na alta. Não foram detectadas diferenças significativas no desempenho natatório nem na morfologia externa dos girinos expostos aos tratamentos testados. Os resultados indicam que o cobre reduz a sobrevivência de girinos de *S. fuscovarius* em concentrações ambientalmente relevantes, porém a elevação moderada da temperatura não intensificou seus efeitos tóxicos nas condições experimentais avaliadas. Este estudo fornece dados inéditos sobre a sensibilidade de uma espécie neotropical ao cobre, contribuindo para curvas de sensibilidade de espécies e para avaliações de risco ambiental mais representativas da fauna anfíbia tropical.

Palavras-chave: Toxicidade, Sobrevivência, CL₅₀, Morfologia, comportamento

ABSTRACT

Metals occur naturally in aquatic ecosystems; however, anthropogenic activities such as agriculture and mining have intensified their release into these environments. Copper is an essential micronutrient, but at elevated concentrations it can exert toxic effects and disrupt the homeostasis of exposed organisms, particularly amphibians, whose larval stages show a high capacity for absorption and bioaccumulation of contaminants through the gills, skin, and gastrointestinal tract. In parallel, increasing global temperatures may modulate metal toxicity, potentially resulting in additive or synergistic effects. In this study, we experimentally evaluated the lethal and sublethal effects of copper sulfate (CuSO_4) contamination under two thermal scenarios (25 °C and 30 °C) in tadpoles of the species *Scinax fuscovarius*. Acute toxicity was assessed through a factorial experiment combining increasing copper concentrations and temperature, in which tadpoles were exposed for 96 hours and survival was used to estimate the median lethal concentration (LC_{50} 96 h). To evaluate sublethal effects, we conducted a 14-day chronic experiment combining temperature and a sublethal copper concentration (20% of the LC_{50}), in which swimming behavioral parameters and changes in overall external morphology were analyzed using geometric morphometric techniques. Survival differed significantly among treatments, with complete mortality observed at the highest copper concentration, regardless of the thermal scenario. Increased temperature did not alter copper toxicity, and the estimated 96-h LC_{50} was 0.235 mg/L at 25 °C and 0.236 mg/L at 30 °C. No significant differences were detected in swimming performance or external morphology of tadpoles exposed to the tested treatments. The results indicate that copper reduces the survival of *S. fuscovarius* tadpoles at environmentally relevant concentrations; however, a moderate increase in temperature did not intensify its toxic effects under the experimental conditions evaluated. This study provides novel data on the sensitivity of a Neotropical species to copper, contributing to species sensitivity distributions and to environmental risk assessments that are more representative of tropical amphibian fauna.

Keywords: Toxicity, Survival, LC_{50} , Morphology, Behavior

INTRODUÇÃO

Os metais são elementos químicos naturalmente presentes nos ecossistemas aquáticos, sendo liberados por processos de sedimentação de matrizes geológicas (BABY *et al.*, 2010; CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). Em concentrações naturais, alguns metais desempenham funções fisiológicas e bioquímicas essenciais em diversos organismos (BRIX *et al.*, 2011; AIGBERUA *et al.*, 2018; RUTHSATZ e GLOS, 2024). No entanto, quando suas concentrações excedem os níveis naturais, podem provocar toxicidade e afetar os sistemas reprodutivo, endócrino, neurológico e enzimático (FERREIRA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2020; CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024;).

A biodisponibilidade de metais é fortemente influenciada pelas condições físico-químicas dos ambientes (VÄÄNÄNEN *et al.*, 2018; ADAMS *et al.*, 2020) e sua liberação é frequentemente intensificada por atividades antrópicas, como rejeitos de mineração, efluentes industriais, processos metalúrgicos e esgoto doméstico (GUEDES *et al.*, 2005; GIROTTO, 2020). Nesse contexto, o aumento das concentrações de metais decorrente de atividades antrópicas representa uma ameaça à integridade dos ecossistemas de água doce, os quais estão entre os ambientes mais diversos do planeta e desempenham papel essencial na manutenção da biodiversidade e da homeostase ecológica (DAYTON, 2019; GOHER *et al.*, 2019). Esse aumento das concentrações de metais nos corpos hídricos resulta na exposição da biota aquática a diferentes níveis de toxicidade desses elementos (HU *et al.*, 2021).

Entre a biota aquática, os anfíbios destacam-se como o grupo de vertebrados com maior declínio populacional e elevadas taxas de extinção em escala global, com cerca de 41% das espécies ameaçadas (CEBALLOS *et al.*, 2020; IUCN, 2025). Esses declínios têm ocorrido em função de fatores como a perda e fragmentação de habitats, poluição, mudanças climáticas, doenças e superexploração (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2023; LUEDTKE *et al.*, 2023). Devido as características fisiológicas, como a alta permeabilidade da pele, a respiração cutânea e o ciclo de vida bifásico, a contaminação do habitat representa um importante fator de ameaça para os anfíbios (GALLANT *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2024). Essa vulnerabilidade é ainda maior nas fases de ovo e larval, uma vez que a maioria

das espécies realiza a fertilização e o desenvolvimento embrionário externamente, com ovos desprovidos de casca protetora depositados na água. Além disso, os girinos permanecem confinados em corpos d'água durante todo o seu desenvolvimento (GALLANT *et al.*, 2007; SCHIESARI *et al.*, 2007; KELEPERTZIS *et al.*, 2012). Para além dessa condição, diversas espécies de anfíbios depositam seus ovos em corpos d'água que estão frequentemente sujeitos à introdução de metais e outros contaminantes químicos decorrentes de atividades antrópicas, em locais como áreas urbanas, industriais, agrícolas e de mineração (BAKER *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2024). Como exemplo, é possível destacar o rompimento da barragem de minério de Fundão, em Mariana-MG, que ocasionou a liberação exacerbada de metais na água (FREITAS *et al.*, 2016; GIROTTO *et al.*, 2020).

Dentre os diferentes tipos de metais, a exposição ao cobre pode causar efeitos adversos sobre a biodiversidade, variando conforme a espécie, concentração e condições físico-químicas presentes no ambiente (NOR, 1985; ADAMS *et al.* 2020; PESCE *et al.* 2025). Embora seja um elemento essencial para diversos organismos e possa exercer efeitos benéficos em baixas concentrações, em níveis elevados exerce correlações negativas com a sobrevivência de espécies aquáticas (HOSSAIN e RAKKIBU, 1999; ADAMS *et al.*, 2020; SMRITI *et al.*, 2023). Sob essa perspectiva, as concentrações de cobre em ambientes aquáticos são frequentemente elevadas por atividades antrópicas como a liberação de efluentes industriais, mineração e agricultura (GOHER, 2019; PESCE *et al.*, 2025). Além de desencadear mortalidade, a toxicidade do cobre pode resultar em efeitos subletais como deformidades morfológicas (BRANDÃO *et al.*, 2011) e prejuízos relacionados ao desempenho natatório (CHEN *et al.*, 2007; GARCÍA-MUÑOZ *et al.*, 2009). Em conjunto, esses efeitos reduzem a capacidade dos anfíbios de completar seu ciclo de vida, especialmente sob maiores níveis de contaminação (RUTHSATZ e GLOS, 2024).

Em regiões tropicais, a reprodução da maioria das espécies de anfíbios, e consequentemente a presença de girinos nos ambientes aquáticos, ocorre em grande parte durante a estação chuvosa, quando há maior disponibilidade de água (PROVETE *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2017a). A estação chuvosa no Brasil ocorre de forma predominante durante o verão, sendo acompanhada pelas maiores médias de temperatura do ano (BRESCIANI *et al.* 2023). Nessa estação, as altas temperaturas atmosféricas favorecem a evaporação e a

consequente redução do volume de água nas poças temporárias, o que eleva a temperatura e intensifica as variações térmicas diárias nesses ambientes (MANN *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2016), resultando em extremos microclimáticos. De acordo com a 2ª avaliação global de anfíbios IUCN SSC Amphibian Specialist Group (2023), as mudanças climáticas se encaixam como o segundo maior fator de ameaça às espécies, com destaque nas variações extremas de temperatura como um dos principais fatores de estresse para os anfíbios.

Em girinos, assim como em outros animais ectotérmicos aquáticos, a temperatura é uma variável que influencia diretamente as respostas fisiológicas (FONTENOT e LUTTERSCHMIDT, 2011; FREITAS *et al.*, 2017a). Variações térmicas no ambiente podem alterar o comportamento, a taxa de desenvolvimento, a digestão e a visão dos girinos, resultando em alterações no desempenho fisiológico (MURATA e YAMAUCHI, 2005; FREITAS *et al.*, 2017b; GREEN e SALICE, 2020). Além de seus efeitos isolados, a temperatura atua como um importante modulador da toxicidade de contaminantes, influenciando tanto as propriedades químicas dos poluentes quanto as respostas fisiológicas dos organismos (NOYES *et al.*, 2009; HOOPER *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2016). Em águas mais quentes, as reações químicas e biológicas ocorrem mais rapidamente, o que pode intensificar os efeitos tóxicos e aumentar a biodisponibilidade de compostos químicos (MIDDLEBROOKS *et al.*, 1973; HRDINKA *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2017a). Por outro lado, em alguns casos o aumento da temperatura pode reduzir o tempo de exposição aquática e, consequentemente, a toxicidade total (ROHR *et al.*, 2011). Dessa forma, como os girinos têm suas funções fisiológicas fortemente dependentes da temperatura ambiental (FONTENOT e LUTTERSCHMIDT, 2011), em habitats rasos e efêmeros, as flutuações térmicas podem ser acentuadas, reduzindo o oxigênio dissolvido e elevando a demanda metabólica, o que aumenta a suscetibilidade aos efeitos de xenobióticos (BLAUSTEIN *et al.*, 2010; KAUR *et al.*, 2011; MOE *et al.*, 2013). Nesse sentido, considerando que os impactos isolados tanto da contaminação por metais, quanto das mudanças climáticas, comprometem o desenvolvimento e a sobrevivência dos girinos, é esperado que, ao atuarem simultaneamente, esses efeitos possam ser aditivos e/ou sinérgicos, amplificando assim o risco para as espécies.

Uma forma eficaz de avaliar os efeitos letais de estressores em girinos é por meio da análise da taxa de sobrevivência e posterior definição da concentração letal para 50% da população estudada (CL₅₀ 96h), utilizando testes de exposição aguda (e.g. COSTA e NOMURA, 2016; FREITAS *et al.*, 2017a; GIROTTO *et al.*, 2020). Já os efeitos subletais podem ser identificados a partir de experimentos de exposição crônica e da análise de alterações em atributos específicos dos girinos, como modificações na morfologia externa geral e na atividade natatória (CHEN *et al.*, 2007; GARCÍA-MUÑOZ *et al.*, 2009; KATZENBERGER *et al.*, 2014). Os anfíbios são amplamente reconhecidos como bioindicadores da qualidade ambiental devido à sua ampla distribuição e elevada sensibilidade a diferentes fatores de estresse (KELEPERTZIS *et al.*, 2012). Além disso, os girinos apresentam alta plasticidade fenotípica, o que os torna bons organismos-modelo para estudos ecotoxicológicos, pois respondem de forma rápida a alterações nas condições ambientais (VAN BUSKIRK e RELYEA 1998; VAN BUSKIRK, 2009).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar experimentalmente os efeitos letais e subletais da contaminação da água por cobre em dois cenários de temperaturas sobre girinos da espécie *Scinax fuscovarius*. De forma específica, para efeitos letais, mensuramos a taxa de sobrevivência em concentrações crescentes de cobre em dois cenários de temperatura, além de calcular o CL₅₀ 96h da espécie. Para efeitos subletais, analisamos alterações na morfologia geral externa dos girinos expostos por meio de técnicas de morfometria geométrica. Além disso, analisamos mudanças comportamentais na atividade natatória por meio da avaliação da distância total percorrida e da velocidade máxima atingida no 1º estímulo, além da média de velocidade máxima atingida pelos girinos expostos a contaminação em dois cenários de temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de espécimes e sistema experimental

Coletamos girinos de *Scinax fuscovarius* no estágio 25 (GOSNER, 1960), utilizados como modelo na experimentação. A espécie *S. fuscovarius* é um anfíbio de médio porte com hábitos predominantemente noturnos e arborícolas. Sua reprodução ocorre entre os meses de

setembro e março, em ambientes aquáticos como brejos, poças e riachos rasos, onde os machos vocalizam no solo ou na vegetação marginal. A desova é depositada no fundo dos corpos d'água, entre detritos vegetais, podendo conter até 2000 ovos (ETEROVICK *et al.*, 2010). A espécie é amplamente distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia (FROST, 2026) e, de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), é classificada como fora de perigo de extinção (i.e. Pouco Preocupante – LC) (IUCN, 2025).

Em dezembro de 2024, coletamos os girinos em um mesmo dia em um corpo d'água lântico no município de Carangola-MG, localizado em área rural, próximo a uma rodovia. Apesar da proximidade com pastagens, o local não sofre influência de agricultura ou de atividades industriais, (20°46'39.76"S 42°02'04.37"W).

Os girinos foram acondicionados em sacos plásticos com água da poça e foram levados ao laboratório experimental do Museu de Zoologia Newton Baião de Azevedo da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), unidade de Carangola - MG.

Em laboratório e sob condições controladas (temperatura média do ar = $25,3 \pm 0,3$ °C; fotoperíodo 12h claro/12h escuro), os girinos foram mantidos em um único aquário de armazenamento para posterior experimentação. Os girinos foram alimentados *ad libitum* a com ração para peixes ornamentais. Como unidades experimentais (u.e.), utilizamos potes plásticos com 500ml d'água descloretada e sem adição de substrato. As posições das u.e. foram aleatorizadas por meio de sorteio entre os tratamentos. Os girinos foram aclimatados nas u.e. por um período de 24 horas antes do início das exposições.

Foram conduzidos dois experimentos fatoriais, nos quais foram combinados diferentes níveis de contaminação por cobre sob diferentes cenários de temperatura da água. Para a definição das concentrações de cobre, utilizamos sulfato de cobre (CuSO₄) em pó (Sigma-Aldrich, 451657). A escolha do cobre como contaminante ocorreu pelo fato de se tratar de um metal investigado em estudos ecotoxicológicos, com efeitos negativos descritos para diferentes espécies de anfíbios em fase larval (BRANDÃO *et al.*, 2011; GÜRKAN e HAYRETDAG, 2012; FRANCO-DE-SÁ e VAL, 2014), e pela presença do mesmo no laudo técnico preliminar dos impactos ambientais decorrentes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, realizado pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (IBAMA, 2015). O ponto de partida das concentrações utilizadas nos experimentos foi baseado nos valores observados na resolução

357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) (BRASIL, 2005), para águas doces do tipo III no Brasil. Com base no referencial máximo permitido na resolução, as concentrações foram aumentadas gradualmente e foram definidas com base em estudos pilotos e experimentos já conduzidos (*artigo em preparação*). Para a preparação da solução estoque, adicionamos 0,025g de CuSO_4 em 200ml de água destilada para obter uma solução com 49,5 mg/L de cobre, e a partir da solução estoque realizamos as pipetagens para cada tratamento.

Quanto à temperatura, submetemos os girinos a dois cenários com o intuito de simular o aumento de temperatura da água previsto por um cenário de mudanças climáticas, sendo eles ($T_{\text{ambiente}} = 25^\circ \text{C}$, $T_{\text{alta}} = 30^\circ \text{C}$). Esse aumento de 5°C em relação à temperatura ambiente é baseado em um dos cenários simulados e apresentados no relatório do IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas) (IPCC, 2023). Além disso, estudos ecotoxicológicos utilizam esse aumento de temperatura como variável (e.g. FREITAS *et al.*, 2016, FREITAS *et al.*, 2017a, FREITAS *et al.*, 2017b). Para controlar as temperaturas, inserimos as u.e. em banho-maria em bandejas plásticas com a temperatura da água sendo controlada por aquecedores com termostato (Roxin, Q3 100W). Monitoramos a temperatura da água em cada unidade experimental diariamente com o auxílio de um termômetro digital.

Em ambos os experimentos, os girinos sobreviventes foram mortos em solução de benzocaína (100 mg/l) e preservados em solução de formol a 10%. Todo o material testemunho será depositado na coleção de girinos do Museu de Zoologia Newton Baião de Azevedo (UEMG – Carangola). Os espécimes foram coletados sob a licença SISBIO 80519-1 (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), e a experimentação foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEMG, conforme o protocolo 007/2022.

Experimento de exposição aguda

Na exposição aguda, conduzimos um experimento fatorial combinando diferentes concentrações de cobre com dois cenários de temperatura (T_{ambiente} e T_{alta}). Em ambos os cenários térmicos, testamos seis concentrações de cobre: Controle= 0 mg/L, T1= 0.025 mg/L, T2= 0.05 mg/L, T3= 0.1 mg/L, T4= 0.2 mg/L e T5= 0.4 mg/L. Replicamos cada tratamento 4 vezes em cada cenário de temperatura, totalizando 48 u.e., sendo 24 em

T_{ambiente} e 24 em T_{alta}. Em cada u.e. introduzimos 5 girinos no estágio 25 (GOSNER, 1960), coletados aleatoriamente do aquário de armazenamento, totalizando 240 girinos testados. A exposição aguda teve a duração total de 4 dias (i.e., 96h), sendo revisado a cada 24h para contagem do número de girinos sobreviventes e retirada de indivíduos mortos. Ao final do experimento, avaliamos a sobrevivência nos diferentes tratamentos, que também foi utilizada para definição da concentração letal para 50% da população testada (i.e., CL₅₀ 96h). Além disso, mensuramos as variáveis potencial hidrogeniônico (pH), condutividade, oxigênio dissolvido (O₂ dissolvido) e o total de sólidos dissolvidos (TDS) em cada u.e. no último dia de exposição, com o objetivo de posterior comparação entre os tratamentos.

Experimento de exposição crônica

Na exposição crônica, realizamos um experimento fatorial combinando a contaminação por cobre e dois cenários de temperatura. Os tratamentos foram definidos da seguinte maneira: Controle = 0 mg/L + T_{ambiente}; T1 = 20% CL₅₀ (a saber: 0.047 mg/L de cobre) + T_{ambiente}; T2 = 0 mg/l + T_{alta}; T3 = 20% CL₅₀ + T_{alta}. Utilizamos 20% do valor do CL₅₀ com o intuito de garantir uma maior sobrevivência de girinos para análises posteriores, bem como uma exposição em nível crônico. As temperaturas testadas foram as mesmas utilizadas no experimento de exposição aguda. Inserimos 5 girinos no estágio 25 (GOSNER, 1960) em cada u.e., e replicamos cada tratamento 10 vezes, totalizando 200 girinos e 40 u.e. O experimento teve a duração total de 14 dias (i.e., 336h). Revisamos as u.e. a cada 24h para verificação e retirada de indivíduos mortos. Buscando garantir um nível constante de contaminação por cobre, substituímos a água de cada u.e. e refizemos a aplicação do contaminante a cada quatro dias. Os girinos foram alimentados 24h antes da troca de água e recontaminação. Também mensuramos o pH, condutividade, O₂ dissolvido e TDS em cada u.e. ao final da exposição com o objetivo de posterior comparação entre os tratamentos.

Ao término da exposição, os girinos foram separados de acordo com seus respectivos tratamentos e transferidos para aquários de armazenamento contendo água proveniente das unidades experimentais correspondentes, a fim de manter as condições físico-químicas da água. Em seguida, 30 girinos de cada tratamento foram escolhidos aleatoriamente e adicionados individualmente em uma bandeja, redonda (50 cm de diâmetro), com 1L de água

de seu respectivo aquário de armazenamento, para análise da atividade natatória. Cada girino foi filmado por 1 minuto e 30 segundos, sendo estimulado a cada 30 segundos com um leve toque na cauda utilizando um bastão de vidro. Ao término das gravações, foram mensuradas as seguintes variáveis comportamentais: (I) distância total percorrida (em cm), (II) velocidade máxima atingida no 1º estímulo (em cm/s) e (III) média da velocidade máxima atingida (em cm/s), que foi mensurada por meio da média calculada a partir da velocidade máxima atingida a cada estímulo. As variáveis comportamentais relacionadas à atividade natatória foram mensuradas com auxílio do software Kinovea versão 2023.1.2

Ao final do experimento, coletamos aleatoriamente 15 girinos de cada tratamento para avaliação da morfologia geral externa. Com o auxílio de gel de ultrassom e água, posicionamos os girinos em uma placa de Petri e utilizamos um sistema padronizado com escala e marcação de identificação individual, para obtenção de fotografias em vista lateral para avaliação de variações na forma utilizando técnicas de morfometria geométrica. As imagens foram obtidas com o auxílio de uma câmera Canon EOS Rabel T100, equipada com a lente EF-S 18-55mm, em um tripé com 50 cm de altura. Definimos 25 *landmarks* em cada girino (marcos anatômicos em pontos homólogos) em vista lateral (modificado de VAN BUSKIRK, 2009; ARENDT, 2010; KATZENBERGER *et al.*, 2014) (Figura – S1), seguindo metodologias utilizadas em análises morfométricas em girinos (MARQUES e NOMURA 2015; SHERRATT *et al.*, 2018; ILIĆ *et al.*, 2019). As configurações de *landmarks* geram um sistema de coordenadas em plano cartesiano que descreve a forma corporal dos organismos, permitindo a análise da variação morfológica independentemente dos efeitos de tamanho, posição e rotação (MARQUES e NOMURA, 2015). A digitalização dos *landmarks* foi realizada por meio dos softwares tpsUtil e tpsDig2.

Análises estatísticas

Experimento de exposição aguda

Planejamos as análises para sobrevivência considerando um modelo fatorial (6 tratamentos $\times$ 2 temperaturas). Entretanto, as respostas biológicas observadas resultaram em distribuições que violaram os pressupostos de modelos como ANOVA *two-way*, GLM e GLMM. Diante disso, optamos por conduzir a análise de sobrevivência utilizando 12 grupos independentes, correspondentes a cada combinação entre tratamento e temperatura (por

exemplo: C_amb, C_alta, T1_amb, T1_alta etc.). Neste caso, realizamos o teste de Kruskal–Wallis para comparação da sobrevivência entre os grupos, seguido do teste *post-hoc* de Dunn. Estimamos a concentração letal para 50% da população (CL₅₀ 96h) no cenário em temperatura ambiente e no cenário em temperatura alta por meio de uma Regressão Linear pelo método Probit. Para comparação dos parâmetros físico-químicos da água entre os tratamentos, utilizamos ANOVA's *one-way* seguidos do teste *post-hoc* de Tukey para as variáveis pH, condutividade, O₂ dissolvido e TDS. As análises foram realizadas no software R, versão 4.3.3 (R CORE TEAM, 2024).

Experimento de exposição crônica

Não analisamos a sobrevivência devido à baixa mortalidade durante a exposição. Após seleção dos *landmarks*, utilizamos a superimposição de Procrustes para visualizar a variação da forma sem considerar os efeitos de tamanho, posição e orientação (ROHLF, 1990; MONTEIRO e REIS, 1999; ZELDITCH *et al.*, 2012). Em seguida, realizamos uma Análise de Componentes Principais (PCA) baseada na matriz de variância/covariância das coordenadas de Procrustes com o objetivo de descrever a variação da forma dos girinos nos tratamentos. Posteriormente, aplicamos uma Análise de Variáveis Canônicas (CVA) utilizando as formas médias de todos os girinos para verificar se há uma ordenação entre os tratamentos. Enquanto a CVA permite uma avaliação mais robusta das variações de forma entre os tratamentos, a PCA é mais adequada para descrever a variação de forma entre indivíduos de um mesmo tratamento (ZELDITCH *et al.*, 2012). Para avaliar as diferenças nas configurações de forma entre os pares de tratamentos, calculamos uma matriz de distâncias de Procrustes, e por fim, fizemos um teste de permutação (10.000 randomizações) para avaliar a significância estatística entre os tratamentos (KLINGENBERG e MCINTYRE, 1998). Todas as análises morfométricas foram realizadas no software MorphoJ, versão 1.06d (KLINGENBERG, 2011).

Para as variáveis comportamentais, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para comparar os valores de distância total e média de velocidade máxima atingida pelos girinos. Para a variável velocidade máxima atingida, utilizamos uma ANOVA *one-way*. Para os parâmetros pH, TDS, condutividade em exposição crônica, realizamos o teste Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. Utilizamos ANOVA para o O₂ dissolvido, seguido do

teste Tukey. Essas análises foram realizadas no software R, versão 4.3.3 (R Core Team, 2024).

RESULTADOS

Experimento de exposição aguda

Observamos diferença na sobrevivência dos girinos entre os tratamentos ($H_{(11)} = 37.344$; $p < 0.01$). A sobrevivência em temperatura ambiente diferiu entre o tratamento T5_amb e os tratamentos C_amb ($p = 0.040$), T1_amb ($p = 0.040$) e T2_amb ($p = 0.039$) (Tabela 1). Esses resultados indicam que na temperatura ambiente houve uma redução na sobrevivência com o aumento dos níveis de contaminação, especialmente no nível mais agudo. De forma semelhante, em temperatura alta as principais diferenças foram apresentadas entre o tratamento T5_alt e os grupos C_alt ($p = 0.038$), T1_alt ($p = 0.037$), T2_alt ($p = 0.036$) e T3_alt ($p = 0.035$). É importante destacar que não houve diferença entre C_amb e C_alt ($p = 1.000$). Além disso, a ausência de diferença entre os tratamentos homólogos representantes das duas temperaturas, juntamente com a distribuição semelhante dos dados observada, sugere que a temperatura não teve influência no efeito do cobre sobre os girinos, indicando uma ausência de interação entre os dois fatores (Figura 1, Tabela 1). O valor de CL_{50} 96h na temperatura ambiente foi de 0.235 mg a.i./L. Já na temperatura alta, o valor de CL_{50} 96h foi de 0.236 mg a.i./L, reforçando o resultado de que a temperatura não intensificou o efeito do cobre na sobrevivência dos girinos.

Observamos diferenças no pH entre os tratamentos ($F_{(11)} = 3.153$; $p < 0.01$). A diferença ocorreu apenas nos tratamentos representantes da temperatura ambiente, sendo manifestada entre o tratamento T5_amb os tratamentos T3_amb ($p = 0.008$) e T4_amb ($p = 0.003$). Também houve diferença entre T5_alt x T4_amb ($p = 0.027$) (Figura 2A). A condutividade também diferiu entre os tratamentos ($F_{(11)} = 8.497$; $p < 0.01$), sendo expressa entre os tratamentos de diferentes temperaturas, como, por exemplo, o tratamento C_alt diferiu dos tratamentos T1_amb ($p = 0.003$), T2_amb ($p = 0.005$) e T3_amb ($p = 0.019$). O tratamento T5_alt também diferiu em relação a todos os tratamentos representantes da temperatura ambiente ($p < 0.05$). Esses resultados indicam que a condutividade tende a ser maior em tratamentos com temperatura alta (Figura 2B). De forma semelhante, para TDS os

resultados também mostraram diferença entre os tratamentos ($F_{(11)} = 7.963$; $p < 0.001$), ocorrendo entre tratamentos de diferentes temperaturas, como, por exemplo, o tratamento C_alt diferiu dos tratamentos T1_amb ($p = 0.005$), T2_amb ($p = 0.006$), T3_amb ($p = 0.027$). O tratamento T5_alt também diferiu em relação a todos os tratamentos representantes da temperatura ambiente ($p < 0.05$). Esses resultados indicam uma tendência de maior TDS em tratamentos de temperatura alta (Figura 2C). Por fim, o O₂ dissolvido também diferiu entre tratamentos ($F_{(11)} = 5.028$; $p < 0.001$). Em contraste com a condutividade e TDS, as diferenças no O₂ dissolvido entre os tratamentos apresentam resultados adversos que indicam inconsistência nos efeitos dos tratamentos sobre o O₂ dissolvido. Por exemplo, o tratamento C_alt diferiu dos tratamentos T2_alt ($p = 0.013$), T4_alt ($p = 0.029$) e T3_amb ($p = 0.029$). Também houve diferenças entre o tratamento T5_amb e os tratamentos T3_amb ($p = 0.005$), T4_amb ($p = 0.029$) e T2_alt ($p = 0.002$), (Figura 2D).

Experimento de exposição crônica

Observamos que não houve mortalidade na exposição crônica. Quanto à variação na morfologia geral externa, observamos que não houve diferenças na forma dos girinos em vista lateral entre os tratamentos (Figuras 3 e 4). Para as análises comportamentais, não observamos diferenças entre os tratamentos nas variáveis (I) distância total ($H_{(3)} = 4.7926$; $p = 0.187$), (II) velocidade máxima atingida no 1º estímulo ($F_{(3)} = 2.189$; $p = 0.093$) e (III) média da velocidade máxima atingida ($H_{(3)} = 5.6566$; $p = 0.129$).

Na exposição crônica, foram encontradas diferenças no pH ($H_{(3)} = 31.593$; $p < 0.001$) entre os tratamentos C x T1 ($P < 0.001$), T1 x T2 ($P < 0.001$) e T2 x T3 ($p = 0.011$), (Figura 5A). A condutividade também diferiu ($H_{(3)} = 19.343$; $p < 0.001$), sendo as diferenças encontradas nas comparações entre C x T3 ($p < 0.001$), T1 x T3 ($p = 0.001$) e T2 x T3 ($p = 0.014$) (Figura 5B). No TDS observamos diferenças entre os tratamentos ($H_{(3)} = 31.633$; $p < 0.001$), em que as diferenças foram entre o tratamento controle e os tratamentos T1 ($p = 0.049$), T2 ($p = 0.006$), e T3 ($p < 0.001$), e na comparação T1 x T3 ($p = 0.019$) (Figura 5C). E por último, também foram encontradas diferenças no O₂ dissolvido ($F_{(3)} = 5.987$; $p = 0.002$). As diferenças ocorreram entre o tratamento controle e os tratamentos T1 ($p = 0.009$) e T3 ($p = 0.071$), além da comparação T1 x T2 ($p = 0.009$) e T2 x T3 ($p = 0.071$), (Figura 5D).

DISCUSSÃO

Identificamos que o aumento da concentração de cobre promoveu redução da sobrevivência dos girinos de *Scinax fuscovarius*, enquanto a temperatura testada não apresentou efeito sobre a sobrevivência, seja de forma isolada ou em interação. O valor de CL₅₀ 96h encontrado foi de 0.235mg/L em temperatura ambiente e 0,236 mg/L em temperatura alta. Esses resultados ressaltam que independentemente da temperatura, a sobrevivência dos girinos reduziu drasticamente apenas no nível mais alto de contaminação ao cobre.

Os efeitos letais do cobre podem estar associados às estruturas de absorção dos girinos em ambientes aquáticos como as brânquias, pele e intestino (SCHLENK e ALMEIDA, 2024). As brânquias, por exemplo, apresentam carga negativa, favorecendo a atração e ligação de íons metálicos de cargas positivas presentes na água, o que potencializa a entrada desses contaminantes no organismo (PAGENKOPF, 1983; MCDONALD *et al.*, 1984). Após a absorção, metais podem desencadear processos de estresse oxidativo pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e sobrecarga dos sistemas antioxidantes (FREITAS, 2024). Com isso, podem ocorrer danos a componentes celulares essenciais que comprometem a homeostase do organismo e levam a disfunções metabólicas e até a morte celular (WINSTON e DI GIULIO, 1991; CARVALHO *et al.*, 2020). Além disso, apesar da ausência de efeito da temperatura, é esperado que respostas antioxidantes sejam moduladas por mudanças na temperatura ambiental, uma vez que a exposição ao calor aumenta o consumo de oxigênio e pode intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (LUSHCHAK, 2011; FREITAS *et al.*, 2017a). Entretanto, essa ausência de efeito pode estar relacionada à elevada tolerância térmica de *S. fuscovarius*, cujo limite térmico crítico máximo (CT_{max}) pode atingir 41,5 °C (CARILO-FILHO *et al.*, 2021). Dessa forma, as condições térmicas testadas, provavelmente permaneceram dentro da faixa de tolerância fisiológica dos girinos.

Apesar da escassez de estudos que abordem os efeitos da interação entre a temperatura e a contaminação por cobre em diferentes espécies de anfíbios, uma revisão realizada por Nin e Rodgher (2021) evidenciou que a temperatura pode influenciar a toxicidade do cobre em organismos aquáticos. Segundo os autores, embora os estudos incluíssem diferentes

grupos, a maioria foi conduzida com peixes, nos quais, em geral, o aumento da temperatura esteve associado ao aumento da toxicidade do cobre, ainda que alguns trabalhos não tenham observado efeito da temperatura. Esses resultados indicam que os efeitos da temperatura sobre a toxicidade do cobre são adversos e podem variar de acordo com a espécie. Neste contexto, embora a temperatura seja um fator abiótico que tem influência sobre as respostas fisiológicas dos anfíbios (FONTENOT JR e LUTTERSCHMIDT, 2011; FREITAS *et al.* 2017a) e sobre a biodisponibilidade e toxicidade dos metais (ADAMS *et al.*, 2020; CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024), nossos resultados indicam que as temperaturas testadas não foram suficientes para promover respostas isoladas detectáveis, nem para alterar a toxicidade do cobre sobre os girinos da espécie *S. fuscovarius*. De forma semelhante aos nossos resultados, um estudo realizado por Brandão *et al.* (2011), avaliou os efeitos do sulfato de cobre em dois cenários de temperatura sobre girinos de *Pelophylax perezi*. Embora tenham avaliado temperaturas mais baixas (20 e 23 °C), os autores também não observaram interação entre temperatura e toxicidade do cobre, sugerindo que dentro da faixa térmica testada, o cobre foi o principal fator determinante da mortalidade.

A semelhança dos valores de CL₅₀ entre os cenários térmicos corrobora com a ausência de influência da temperatura na sobrevivência. Brandão *et al.* (2011) observaram valores de CL₅₀ 96h mais elevados para *P. perezi*, variando entre 0,66 mg/L a 20°C e 0,85 mg/L a 23°C, mas também sem diferença estatística entre as temperaturas. Em outro estudo, os autores demonstraram que temperaturas mais elevadas podem estar associadas a menor sensibilidade ao sulfato de cobre em diferentes espécies, destacando a influência do parentesco filogenético nas respostas toxicológicas (CHIARI *et al.*, 2015). Além disso, estudos que avaliaram os efeitos do cobre sem a temperatura também observaram diferença nos valores de CL₅₀ entre espécies como, por exemplo, para as espécies *Scinax ruber* (CL₅₀ = 36.37 µg/L, i.e. 0.036mg/L) e *Rhinella granulosa* (CL₅₀ = 23.48 µg/L, i.e. 0.023mg/L) (FRANCO-DE-SÁ E VAL 2014). Essa comparação ressalta diferenças na sensibilidade ao cobre mesmo em espécies do mesmo gênero, como *S. ruber* e *S. fuscovarius*. A comparação dos valores de CL₅₀ entre as espécies revela uma variação na sensibilidade interespecífica, que é esperada, visto que as espécies respondem aos estressores ambientais de acordo com suas características fisiológicas e ecológicas (COSTA *et al.*, 2024a).

Girinos expostos a contaminação por metais podem sofrer efeitos subletais durante o

processo de desenvolvimento, incluindo alterações no crescimento, fisiologia e morfologia (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024; SALLA *et al.*, 2024). Neste estudo, não encontramos variações na morfologia geral externa de *S. fuscovarius* em vista lateral em nenhum dos tratamentos, sugerindo que tanto a variação de temperatura quanto as concentrações de cobre avaliadas, de forma isolada ou com interação, não foram suficientes para promover alterações morfológicas detectáveis na espécie. Em contraste com os nossos resultados, Gürkan e Hayrettaş (2012) observaram efeitos morfológicos em girinos de *Bufo viridis* expostos a concentrações de 0,01 a 0,1 mg/L de sulfato de cobre. Os autores apontaram alterações como redução do crescimento e do desenvolvimento larval, além de alterações histológicas e prejuízos comportamentais. Outro estudo também mostrou que a exposição ao cobre resultou em redução do crescimento corporal, com girinos de *Lithobates pipiens* apresentando menor peso quando expostos a concentrações subletais de 0,06 e 0,16 mg/L em comparação ao controle (LANDÉ e GUTTMAN, 1973). Paralelamente, Haywood *et al.*, (2004) indicaram que o cobre em concentrações subletais entre 0,1 mg/L e 0,3mg/L causou uma redução na taxa de crescimento e no tamanho corporal em girinos de *Xenopus laevis*. Embora não tenhamos encontrado alterações na morfologia externa de *S. fuscovarius* em vista lateral, outros efeitos subletais podem ser analisados, os quais tem potencial para afetar direta ou indiretamente a sobrevivência e o desempenho individual de girinos (COSTA *et al.*, 2024).

Observamos que as concentrações de cobre testadas e a variação na temperatura não causaram alterações comportamentais nos girinos de *S. fuscovarius*. Conhecidamente, as diferentes estruturas morfológicas dos girinos estão associadas a comportamentos de alimentação e fuga, sendo que alterações podem influenciar nas decisões comportamentais e aumentar o risco de predação, além de interferir na obtenção de alimento e comprometer o potencial competitivo (VAN BUSKIRK e RELYEA, 1998; VAN BUSKIRK e MCCOLLUM, 2000; ARENDT, 2009). Araújo *et al.* (2014) observaram que girinos das espécies *Leptodactylus latrans*, *Lithobates catesbeianus* e *Pelophylax perezi* evitaram o cobre a partir de 100 µg/L (e.g. 0,1 mg/L) e apresentaram mortalidade imediata em concentrações acima de 450 µg L (e.g. 0,45 mg/L). Em outro exemplo, Hayden *et al.* (2015) demonstraram um aumento de até três vezes nos ataques de larvas de libélula sobre girinos da espécie *Lithobates sylvaticus* expostos a concentrações subletais de cobre (1,85 µg/L, i.e. 0,001 mg/L) em temperatura elevada (22 °C). Nesse sentido, o contraste entre nossos

resultados e os estudos citados indica que os girinos de *S. fuscovarius* podem apresentar maior tolerância comportamental à exposição ao cobre, mesmo sob variação térmica. Isso reforça a importância das diferenças interespecíficas na avaliação das respostas ecotoxicológicas frente diferentes contaminantes.

Em ambientes aquáticos, a toxicidade do cobre pode ser influenciada por características físico-químicas da água. Por exemplo, a força iônica e composição dos íons dissolvidos podem interagir com o Cu^{2+} e alterar sua especiação química, além de competir pelo contato com os sítios biológicos de absorção (VÄÄNÄNEN *et al.*, 2018; ADAMS, 2020). Em águas com pH alcalino, a maior disponibilidade de íons OH^- favorece a ligação com os íons positivos metálicos que formam hidróxidos metálicos insolúveis, o que resulta na precipitação do cobre e na diminuição de sua biodisponibilidade (MAGALHÃES *et al.*, 2015). Por outro lado, em águas com o pH ácido, a predominância de íons H^+ em relação aos íons OH^- impede a formação de complexos com metais, uma vez que ambos possuem carga positiva, favorecendo a permanência do cobre na forma dissolvida e, consequentemente, aumentando sua biodisponibilidade (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). Paralelamente, pH reduzido também pode estimular a liberação de metais adsorvidos ao sedimento para a coluna d'água (LI *et al.*, 2013). Nossos resultados ressaltam diferenças nos valores de pH entre os tratamentos, os quais variam entre 6.83 e 7.38 na exposição aguda e 7.2 e 7.54 na exposição crônica. Embora existam diferenças entre os tratamentos, a faixa estreita de variação dos valores de pH observados os tornam pouco relevantes biologicamente quando comparado aos intervalos que caracterizam condições de pH ácidas ou básicas ambientes naturais (BRASIL, 2021).

Parâmetros como TDS e condutividade são relacionados como indicadores indiretos da concentração iônica da água e, em geral, apresentam correlação, uma vez que o aumento de íons dissolvidos tende a elevar a condutividade do meio (RUSYDI, 2018). Contudo, essa relação pode não ser linear e variar conforme a composição iônica e as condições físico-químicas entre diferentes tipos de água (MOHIT e SUPRITA, 2022). As análises estatísticas confirmaram o padrão visual observado nos gráficos, indicando que tanto a condutividade quanto o TDS foram maiores nos tratamentos de temperatura alta. Embora não testado, esse comportamento semelhante entre os dois parâmetros reforça a ideia de que haja correlação

entre condutividade e TDS. Nesse contexto, estudos experimentais indicam que a toxicidade do cobre não depende de valores absolutos de TDS, mas principalmente da identidade e da concentração dos íons presentes na água (ERICKSON *et al.*, 1996). Assim, embora a temperatura elevada tenha aumentado a condutividade e o TDS, a ausência de diferença entre tratamentos da mesma temperatura aliada à ausência de informações sobre a composição iônica da água, reforça que essas variações, isoladamente, não foram suficientes para alterar de forma determinante a biodisponibilidade e a toxicidade do cobre nos girinos.

O O₂ dissolvido também pode alterar a biodisponibilidade dos metais influenciando o potencial redox do ambiente (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). Em condições aeróbias a oxidação de metais associados à matéria orgânica pode ser favorecida, aumentando sua mobilização a partir do sedimento para a coluna d'água (LI *et al.*, 2013). Por outro lado, em ambientes anóxicos, processos de adsorção tendem a ser favorecidos, promovendo a retenção dos metais no sedimento (KANG *et al.*, 2019). No presente estudo, as variações nas concentrações de O₂ dissolvido foram inconsistentes entre os tratamentos, variando entre 3 e 4 mg/L. Esse padrão indica que, nas condições experimentais avaliadas, o O₂ dissolvido não exerceu influência determinante sobre a biodisponibilidade e a toxicidade do cobre nos girinos.

De modo geral, apesar da ausência de efeito da temperatura sobre a toxicidade do cobre e sobre os girinos de forma isolada, os resultados deste estudo ampliam o conhecimento sobre a toxicidade do cobre em girinos de *S. fuscovarius*, indicando que esse metal pode representar um fator de risco relevante nas fases iniciais do desenvolvimento. Essas informações podem contribuir para elaboração de diretrizes de qualidade da água considerando espécies tropicais, uma vez que as diretrizes brasileiras, como a Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005), são baseadas em dados ecotoxicológicos obtidos a partir de organismos-padrão internacionalmente aceitos, como microcrustáceos e peixes (PASSOS *et al.*, 2018).

O estágio larval representa um período importante no ciclo de vida dos anfíbios, pois concentra altas taxas de mortalidade natural e determina o sucesso do recrutamento de indivíduos juvenis para a população adulta (COSTA *et al.*, 2024). Nesse contexto, os efeitos subletais da exposição ao cobre podem gerar prejuízos no desenvolvimento e redução no

número de girinos que alcançam a fase adulta (CARVALHO e PINTO-VIDAL, 2024). Adicionalmente, o aumento da temperatura também pode gerar efeitos subletais sobre o desenvolvimento larval, que também resultam na redução do número de indivíduos recrutados para a população adulta (FREITAS, 2017a). Dessa forma, embora não tenham sido observados efeitos subletais nas concentrações de cobre e temperaturas testadas neste estudo, a toxicidade do cobre indica que a contaminação de corpos d'água pode atuar como um fator limitante indireto para a persistência populacional da espécie (SALLA *et al.*, 2024).

Os valores de CL_{50} obtidos indicam a sensibilidade dos girinos de *S. fuscovarius* a exposição ao cobre e contribuem com a escassez de informações sobre os efeitos do cobre em anfíbios neotropicais. Embora se trate de uma espécie comum, amplamente distribuída e classificada como Pouco Preocupante (FROST, 2026; IUCN, 2025), a determinação de sua sensibilidade ao cobre fornece uma referência importante para comparações interespecíficas, especialmente entre híldeos. Além disso, os dados de toxicidade obtidos podem ser utilizados na construção de curvas de sensibilidade de espécies (SSD's) conforme aplicado por Azizishirazi (2021), permitindo avaliar padrões de sensibilidade e potenciais efeitos do cobre em espécies filogeneticamente próximas. De forma adicional as diretrizes brasileiras de qualidade da água, como a Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005), são baseadas em dados ecotoxicológicos obtidos a partir de organismos-padrão internacionalmente aceitos, como microcrustáceos e peixes (PASSOS *et al.*, 2018). Essa abordagem pode resultar em critérios pouco representativos para a fauna aquática nativa. Nesse contexto, os resultados do presente estudo fornecem informações de sensibilidade de uma espécie nativa brasileira, contribuindo para a identificação de padrões de tolerância de espécies nativas em avaliações de risco ambiental.

Em termos gerais, nossos resultados fornecem informações sobre a sensibilidade de girinos da espécie *S. fuscovarius* sobre a exposição do cobre e ao aumento da temperatura. Esses resultados podem contribuir para reduzir a lacuna sobre os efeitos do cobre sobre girinos de espécies tropicais, ao fornecer dados de sensibilidade de uma espécie nativa brasileira. Além disso, são importantes para estudos de monitoramento ambiental nas populações de anfíbios na América do Sul e podem contribuir para explicar o status atribuído à espécie. Por fim, considerando os efeitos adversos do cobre a depender das condições bióticas e abióticas do ambiente, os resultados reforçam a necessidade de mais estudos que

utilizem análises multifatoriais que considerem as características físico-químicas da água e outros fatores abióticos presentes em ambientes naturais, visando resultados mais realistas para a sensibilidade das espécies tropicais expostas a contaminação ao cobre.

Agradecimentos

Agradecemos ao Museu de Zoologia Newton Bação de Azevedo (MZNB) da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) por ceder o laboratório para a realização dos experimentos. Aos professores Me. Ériton Luis Santolin e Dr. Rafael Almeida de Freitas pela ajuda com os cálculos das concentrações dos metais. Ao professor Dr. Alessandro Marques de Oliveira pela ajuda com as análises morfométricas. À amiga Ma. Gabriela Alves-Ferreira pela ajuda com as análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. et al. **Bioavailability assessment of metals in freshwater environments: A historical review.** Environmental Toxicology and Chemistry, 2020, v. 39, n. 1, p. 48–59.

AIGBERUA, A. O.; TARAWOU, J. T.; ABASI, C. Y. **Effect of oxidation-reduction fluctuations on metal mobility of speciated metals and arsenic in bottom sediments of Middleton River, Bayelsa State, Nigeria.** Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 2018, v. 22, n. 9, p. 1511–1517.

ARAÚJO, C. VM et al. **Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles.** Toxicologia aquática, 2014v. 146, p. 70-75.

ARENDT, J. **Morphological Correlates of Sprint Swimming Speed in Five Species of Spadefoot Toad Tadpoles: Comparison of Morphometric Methods.** Journal of Morphology, 2010, v. 271, n. 9, p. 1044-1052.

AZIZISHIRAZI, A.; KLEMISH, J. L.; PYLE, G. G. **Sensitivity of amphibians to copper.** Environmental Toxicology and Chemistry, 2021, v. 40, n. 7, p. 1808-1819.

BABY, J. et al. **Toxic effect of heavy metals on aquatic environment.** International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2010, v. 4, n. 4.

BAKER, N. J.; BANCROFT, B. A.; GARCIA, T. S. **A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians.** Science of the Total Environment, 2013, v. 449, p. 150–156.

BLAUSTEIN, A. R. et al. **Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations.** Diversity, 2010, v. 2, n. 2, p. 281–313.

BRANDÃO, F. P. et al. **Influência da temperatura na toxicidade do cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi***. Revista Captar, 2011, v. 3, n. 1, p. 66–77.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em:

https://conama.mma.gov.br/?id=450&option=com_sisconama&task=arquivo.download. Acesso em: 23/12/25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 maio 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>. Acesso em: 23/12/2025.

BRESCIANI, C. et al. **Brazilian Annual Precipitation Analysis Simulated by the Brazilian Atmospheric Global Model**. Water, 2023, v. 15, n. 2, p. 256.

BRIX, Kevin V.; ESBAUGH, Andrew J.; GROSELL, Martin. **The toxicity and physiological effects of copper on the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis***. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2011, v. 154, n. 3, p. 261–267.

CALFEE, R. D.; LITTLE, E. E. **Toxicity of cadmium, copper, and zinc to the threatened Chiricahua leopard frog (*Lithobates chiricahuensis*)**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, v. 99, n. 6, p. 679–683.

CARILO FILHO, L. M. et al. **Natural history predicts patterns of thermal vulnerability in amphibians from the Atlantic Rainforest of Brazil**. Ecology and Evolution, 2021, v. 11, n. 23, p. 16462–16472.

CARVALHO, C. S. et al. **Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, v. 196, p. 110560.

CARVALHO, C. S.; PINTO-VIDAL, F. A. Ecotoxicological impacts of metals on amphibian tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 13, p. 270–302.

CEBALLOS, G.; EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. **Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, v. 117, n. 24, p. 13596–13602.

CHEN, Te-Hao; GROSS, J. A.; KARASOV, W. H. **Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*)**. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, v. 26, n. 7, p. 1470–1475.

CHIARI, Y. et al. **Phylogenetic signal in amphibian sensitivity to copper sulfate relative to experimental temperature**. *Ecological Applications*, 2015, v. 25, n. 3, p. 596-602.

COSTA, A. G.; BORGES, Á. M.; SOTO-BLANCO, B. **Metais tóxicos e seus efeitos sobre a reprodução dos animais**. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 2020, v. 14, n. 1, p. 108–124.

COSTA, R. N. et al. How pollutants are affecting amphibian tadpoles: relationship with anthropogenic pollutants and perspectives for the future. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 1, p. 1–26.

COSTA, R. N.; NOMURA, F. **Measuring the impacts of Roundup Original on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole**. *Hydrobiologia*, 2016, v. 765, n. 1, p. 85-96.

DAYTON, Gage H. **Water Availability**. In: FATH, Brian D. (ed.). *Encyclopedia of Ecology*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. v. 3, p. 656-662.

DUBEUX, M. J. M. et al. **Morphological characterization and taxonomic key of tadpoles (Amphibia: Anura) from the northern region of the Atlantic Forest**. *Biota Neotropica*, 2020, v. 20, n. 2, p. e20180718.

ETEROVICK, P. C.; SOUZA, A. M.; SAZIMA, I. **Anuran Amphibians from the Serra do Cipó**. Gráfiön Estúdio Editorial, 2020.

ERICKSON, R. J. et al. **The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, v. 15, n. 2, p. 181-193.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA C. L. N. **Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax***. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 2010, v. 10, n. 2, p. 229–241.

FONTENOT JR, C. L.; LUTTERSCHMIDT, W. I. **Thermal selection and temperature preference of the aquatic salamander, *Amphiuma tridactylum***. *Herpetological Conservation and Biology*, 2011, v. 6, n. 3, p. 395-399.

FRANCO-DE-SÁ, J. F. O.; VAL, A. L. **Copper toxicity for *Scinax ruber* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura) of the Amazon: Potential of Biotic Ligand Model to predict toxicity in urban streams**. *Acta Amazônica*, 2014, v. 44, p. 491-498.

FREITAS, J. S. et al. **Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®)**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2017a, v. 197, p. 32–44.

- FREITAS, J. S. et al. **Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles.** Chemosphere, 2017b, v. 185, p. 548–562.
- FREITAS, J. S. et al. **Influence of temperature on the thyroidogenic effects of Diuron and its metabolite 3, 4-DCA in tadpoles of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*).** Environmental Science & Technology, 2016, v. 50, n. 23, p. 13095-13104.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference.** Version 6.1. Nova York: American Museum of Natural History, 2026. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org>. Acesso em: 08/01/2026.
- GALLANT, A. L. et al. **Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation.** Copeia, v. 2007, n. 4, p. 967–979.
- GARCÍA-MUÑOZ, E.; GUERRERO, F.; PARRA, G. **Effects of copper sulfate on growth, development and escape behavior.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, v. 56, n. 3, p. 557–565.
- GIROTTI, L. et al. **Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the dam rupture in Mariana, MG (Brazil).** Water, Air, & Soil Pollution, 2020, v. 231, n. 7, p. 325.
- GOHER, M. E.; ALI, M. H.H.; EL-SAYED, S. M. **Heavy metals contents in Nasser Lake and the Nile River, Egypt: An overview.** Egyptian Journal of Aquatic Research, 2019, v. 45, n. 4, p. 301–312.
- GOSNER, K. L. **A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification.** Herpetologica, 1960, v. 16, n. 3, p. 183-190.
- GREEN, F. B.; SALICE, C. J. **Increased temperature and lower resource quality exacerbate chloride toxicity to larval *Lithobates sylvaticus* (wood frog).** Environmental Pollution, 2020, v. 266.
- GUEDES, J. A.; LIMA, R. F. S.; Souza L. C. **Metais pesados em água do rio Jundiá-Macaíba/RN.** Revista de Geologia, 2005, v. 18, n. 2, p. 131–142.
- GÜRKAN, M.; HAYRETDAG, S. **Morphological and histological effects of copper sulfate on the larval development of green toad, *Bufo viridis*.** Turk J Zool, 2012, v. 36, n. 2, p. 231-240.
- HAYDEN, M. T. et al. **Thrice as easy to catch! Copper and temperature modulate predator-prey interactions in larval dragonflies and anurans.** Ecosphere, 2015, v. 6, n. 4, p. 1-17.
- HAYWOOD, L. K. et al. ***Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for**

pollution by zinc, copper, lead and cádmium. African Zoology, 2004, v. 39, n. 2, p. 163-174.

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

HOSSAIN, M.; RAKKIBU, Md G. **Effects of copper on aquatic ecosystems-A review.** Khulna University Studies, 1999, p. 259-266.

HRDINKA, T. et al. **Possible impacts of climate change on water quality in streams of the Czech Republic.** Hydrological Sciences Journal, 2015, v. 60, n. 2, p. 192–201.

HU, J. et al. **In situ assessment of genetic and epigenetic alterations in frog *Rana plancyi* and *Rana limnocharis* inhabiting aquatic ecosystems associated with Pb/Zn/Cu mining.** Science of The Total Environment, 2021, v. 779, p. 146139.

IBAMA. **Laudo técnico preliminar:** impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Brasília, DF: Ibama, 2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_Ibama.pdf. Acesso em: 23/10/2025

ILIĆ, M. et al. **Geometric vs. traditional morphometric methods for exploring morphological variation of tadpoles at early developmental stages.** Amphibia-Reptilia, 2019, v. 40, n. 4, p. 499-509.

IPCC – PAINEL INTERGOVERNAMENTAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS. **Mudança Climática 2023:** relatório de síntese do sexto ciclo de avaliação. Tradução de MCTI. Genebra: IPCC, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/sirene/publicacoes/relatorios-do-ipcc/arquivos/pdf/copy_of_IPCC_Longer_Report_2023_Portugues.pdf. Acesso em: 23/10/2025.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2025-2. Gland, Suíça: IUCN, 2025. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 24/10/2025.

IUCN SSC AMPHIBIAN SPECIALIST GROUP. **State of the World's Amphibians:** the second global amphibian assessment. [Texas, EUA]: Re:wild; Gland, Suíça: IUCN, 2023. Disponível em: <https://www.iucn-amphibians.org/state-of-the-worlds-amphibians/> Acesso em: 24/10/2025.

KANG, Mengxin et al. **Effect of dissolved oxygen and nutrient levels on heavy metal contents and fractions in river surface sediments.** Science of the total environment, 2019, v. 648, p. 861-870.

KATZENBERGER, M. et al. **Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles.** PloS one, 2014, v. 9, n. 5, p. e98265.

KAUR, M. et al. **The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch.** Chemico-Biological Interactions, 2011, v. 193, n. 3, p. 216–224.

KELEPERTZIS, E. et al. **Distribution and Accumulation of Metals in Tadpoles Inhabiting the Metalliferous Streams of Eastern Chalkidiki, Northeast Greece.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, v. 63, n. 3, p. 409–420.

KLINGENBERG, C. P. **MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics.** Molecular Ecology Resources, 2011, v. 11, n. 2, p. 353-357.

KLINGENBERG, C. P.; MCINTYRE, G. S. **Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods.** Evolution, 1998, v. 52, n. 5, p. 1363-1375.

LANDÉ, S. P; GUTTMAN, S. I. **The effects of copper sulfate on the growth and mortality rate of *Rana pipiens* tadpoles.** Herpetologica, 1973, p. 22-27.

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

LI, H. et al. **Effect of pH, Temperature, Dissolved Oxygen, and Flow Rate of Overlying Water on Heavy Metals Release from Storm Sewer Sediments.** Journal of Chemistry , 2013, n. 1, p. 434012.

LUSHCHAK, V. I. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.** Aquatic toxicology. 2011, v. 101, n. 1, p. 13-30.

MAGALHÃES, D. P. et al. **Metal bioavailability and toxicity in freshwaters.** Environmental chemistry letters, 2015, v. 13, n. 1, p. 69-87.

MANN, R. M. et al. **Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment.** Environmental Pollution, 2009, v. 157, p. 2903–2927.

MARQUES, N. S.; NOMURA, F. **Where to Live? How Morphology and Evolutionary History Predict Microhabitat Choice by Tropical Tadpoles.** Biotropica, 2015, v. 47, n. 2, p. 227-235.

MCDONALD, D. G.; OZOG, J. L.; SIMONS, B. P. **The influence of low pH environments on ion regulation in the larval stages of the anuran amphibian, *Rana clamitans*.** Canadian Journal of Zoology, 1984, v. 62, n. 11, p. 2171-2177.

MIDDLEBROOKS, E. J. et al. **Effects of temperature on the toxicity to the aquatic**

biota of waste discharges: a compilation of the literature. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, 1973.

MOE, S. J. et al. **Combined and interactive effects of climate change and toxic substances.** Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, v. 32, p. 49–61.

MOHIT, M.; SUPRITA, S. **A review on correlation between the total dissolved salts (TDS) and electrical conductivity (EC) of water samples collected from different area of Bhiwani city, Haryana, India.** International journal of health sciences, 2022, v. 6, n. S6, p. 5431-5438.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica.** 1999. p. 189-189.

MURATA, T.; YAMAUCHI, K. **Low temperature arrest of thyroid hormone–dependent transcription.** Endocrinology, 2005, v. 146, p. 256–264.

NIN, C.; RODGHER, S. **Effect of a temperature rise on metal toxicity for the aquatic biota: a systematic review.** Brazilian Journal of Environmental Sciences, 2021, v.56, n.4, p 710-720.

NOYES, P D. et al. **The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world.** Environment International, 2009, v. 35, p. 971–986.

NOR, Y. M. **Ecotoxicity of copper to aquatic biota.** Environmental Research, 1985, v. 43, n. 1, p. 274–282.

PAGENKOPF, G. K. **Gill Surface Interaction Model for Trace-Metal Toxicity to Fishes: Role of Complexation, pH, and Water Hardness.** Environmental Science e Technology, 1983, v. 17, n. 6, p. 342-347.

PASSOS, A. L. L.; MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA FILHO, E. C. **Critérios para Avaliação da Qualidade de Água no Brasil: Um Questionamento sobre os Parâmetros Utilizados.** Fronteira: Journal of Social, Technological and Environmental Science, 2018, v. 7, n. 2, p. 290-303.

PESCE, S. et al. **The use of copper as plant protection product contributes to environmental contamination and resulting impacts on terrestrial and aquatic biodiversity and ecosystem functions.** Environmental Science and Pollution Research, 2025, v. 32, n. 6, p. 2830-2846.

PROVETE, D. B. et al. **Anuranfauna from northwestern region of the State of São Paulo: species list and taxonomic key for adults.** Biota Neotropica, 2011, v. 11, p. 377–391.

R CORE TEAM. 2024. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

Acesso em: 22/12/2025

ROHR, Jason R. et al. **Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians?: partitioning effects on exposure and susceptibility to contaminants.** Global Change Biology, 2011, v. 17, p. 657–666.

ROHLF, F. James. **Morphometries.** Annual Review of ecology and Systematics, 1990, p. 299-316.

RUSYDI, A. F. **Correlation between conductivity and total dissolved solid in various type of water: A review.** IOP Conf Ser Earth Environ Sci 118. 2018.

RUTHSATZ, K.; GLOS, J. Effects of pollutants on the endocrine system of tadpoles. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles.** Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 5, p. 78–110.

SALLA R. F. et al. Developmental Abnormalities in Tadpoles as Biomarkers to Assess the Ecotoxicity of Traditional and Emerging Pollutants. In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles.** Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 14, p. 303–326.

SCHIESARI, L. S.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. **Biogeographic Biases in Research and Their Consequences for Linking Amphibian Declines to Pollution.** Conservation Biology, 2007, v. 21, p. 465–471.

SCHLENK, D.; ALMEIDA, A. Toxicokinetic Pathways of Environmental Contaminants in Amphibian Tadpoles In: DE ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. **Toxicology of Amphibian Tadpoles.** Boca Raton: CRC Press, 2024. cap. 3, p. 36–62.

SHERRATT, E.; MARION A.; Scott K. J. **Ecomorphological diversity of Australian tadpoles.** Ecology and evolution, 2018, v. 8, n. 24, p. 12929-12939.

SMRITI, A. A.; LODHI, S.; SHUKLA, S. **Copper toxicity in aquatic ecosystem: A Review.** International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2023, v. 11, n. 4, p. 134-138.

VÄÄNÄNEN, K. et al. **Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems: From science to environmental management.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, v. 147, p. 430–446.

VAN BUSKIRK, J.; RELYEA, R. A. **Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles.** Biological Journal of the Linnean Society, 1998, v. 65, n. 3, p. 301-328.

VAN BUSKIRK, J. **Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature?** Ecological Monographs, 2009, v. 79, n. 4, p. 681-705.

VAN BUSKIRK, J.; MCCOLLUM, S. A. **Influence of tail shape on tadpole swimming**

performance. Journal of Experimental Biology, 2000, v. 203, n. 14, p. 2149-2158.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. **Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms.** Aquatic toxicology. 1991, v. 19, n. 2, p. 137-161.

ZELDITCH, M.; SWIDERSKI, D.; SHEETS, H. D. **Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer: An Introduction.** Academic Press, 2012.

FIGURAS E TABELAS

Figura – 1 Número de sobreviventes em função dos diferentes tratamentos em ambas as temperaturas. A linha central das caixas representa a mediana, os limites correspondem aos quartis Q1 e Q3, e os bigodes indicam a variação dos dados até 1,5 vezes o intervalo interquartil.

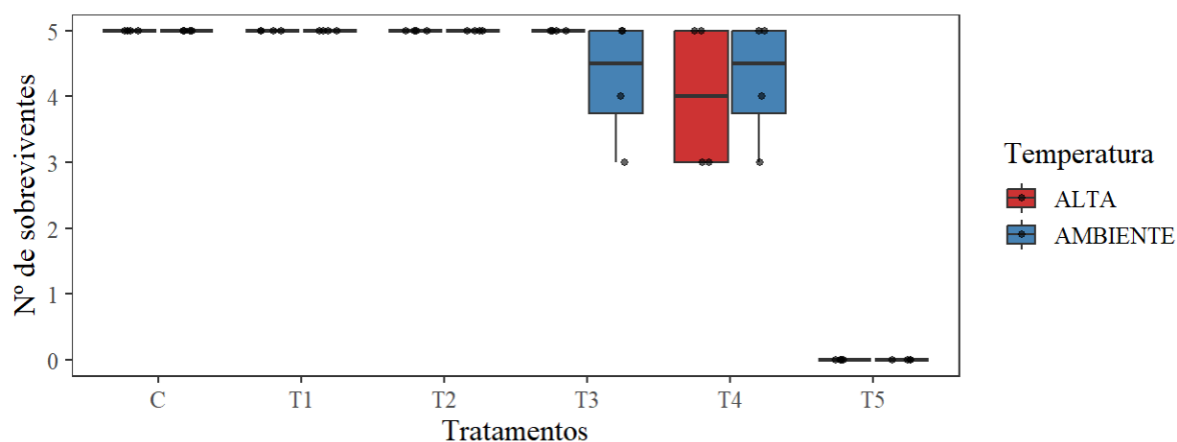


Figura - 2 Parâmetros físico-químicos da água em função dos diferentes tratamentos na exposição aguda, representada por gráficos de média e erro padrão. As barras centrais representam a média de cada grupo, enquanto as hastes indicam o erro padrão da média. (A) representa os valores de pH, (B) condutividade, (C) TDS e (D) O₂ dissolvido.

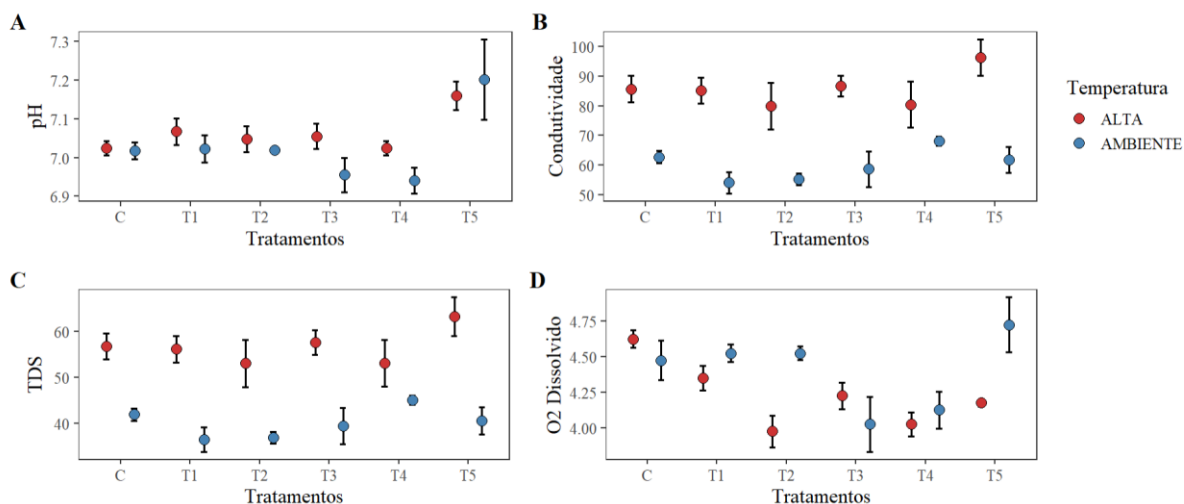


Tabela - 1 Comparações par-a-par para a sobrevivência entre os 12 grupos com os p-valores, obtidas por meio do teste Dunn. Valores significativos estão sinalizados com “*”, e aqueles de maior relevância foram destacados em negrito.

	C_amb	T1_amb	T2_amb	T3_amb	T4_amb	T5_amb	C_alt	T1_alt	T2_alt	T3_alt	T4_alt	T5_alt
C_amb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1_amb	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2_amb	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3_amb	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4_amb	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-
T5_amb	0.040*	0.040*	0.039*	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-
C_alt	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.038*	-	-	-	-	-	-
T1_alt	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.036*	1.000	-	-	-	-	-
T2_alt	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.035*	1.000	1.000	-	-	-	-
T3_alt	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.034*	1.000	1.000	1.000	-	-	-
T4_alt	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-
T5_alt	0.042*	0.042*	0.041*	1.000	1.000	1.000	0.038*	0.037*	0.036*	0.035*	1.000	-

Figura - 3 Diferenças nas formas médias dos girinos expostos aos tratamentos. Vista lateral.

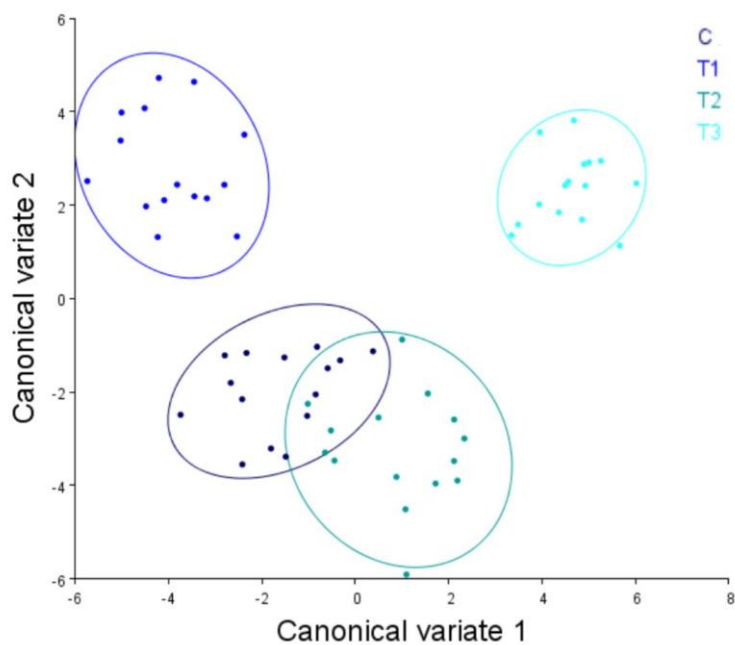


Tabela - 2 Valores de distância de procustes e p-valor da CVA para os tratamentos na análise morfológica.

Vista lateral		
Comparação	Distância de procustes	p-valor
C1 x T1	0,0313	0.274
C1 x T2	0,0239	0.511
C1 x T3	0,0308	0.227
T1 x T2	0,0326	0.124
T1 x T3	0,0346	0.086
T2 x T3	0,0240	0.306

Figura - 4 Grade de transformação e wireframe das mudanças gerais e alterações dentro de cada grupo na morfologia geral externa dos girinos em vista lateral. A grade de transformação e wireframe mostram o movimento dos landmarks e a distorção causada por esse movimento. Em azul claro no wireframe, mostra o consenso da forma (forma média do grupo) e em azul escuro, mostra a forma predita no extremo do eixo PC1 (que explica maior parte da variação dentro do grupo).

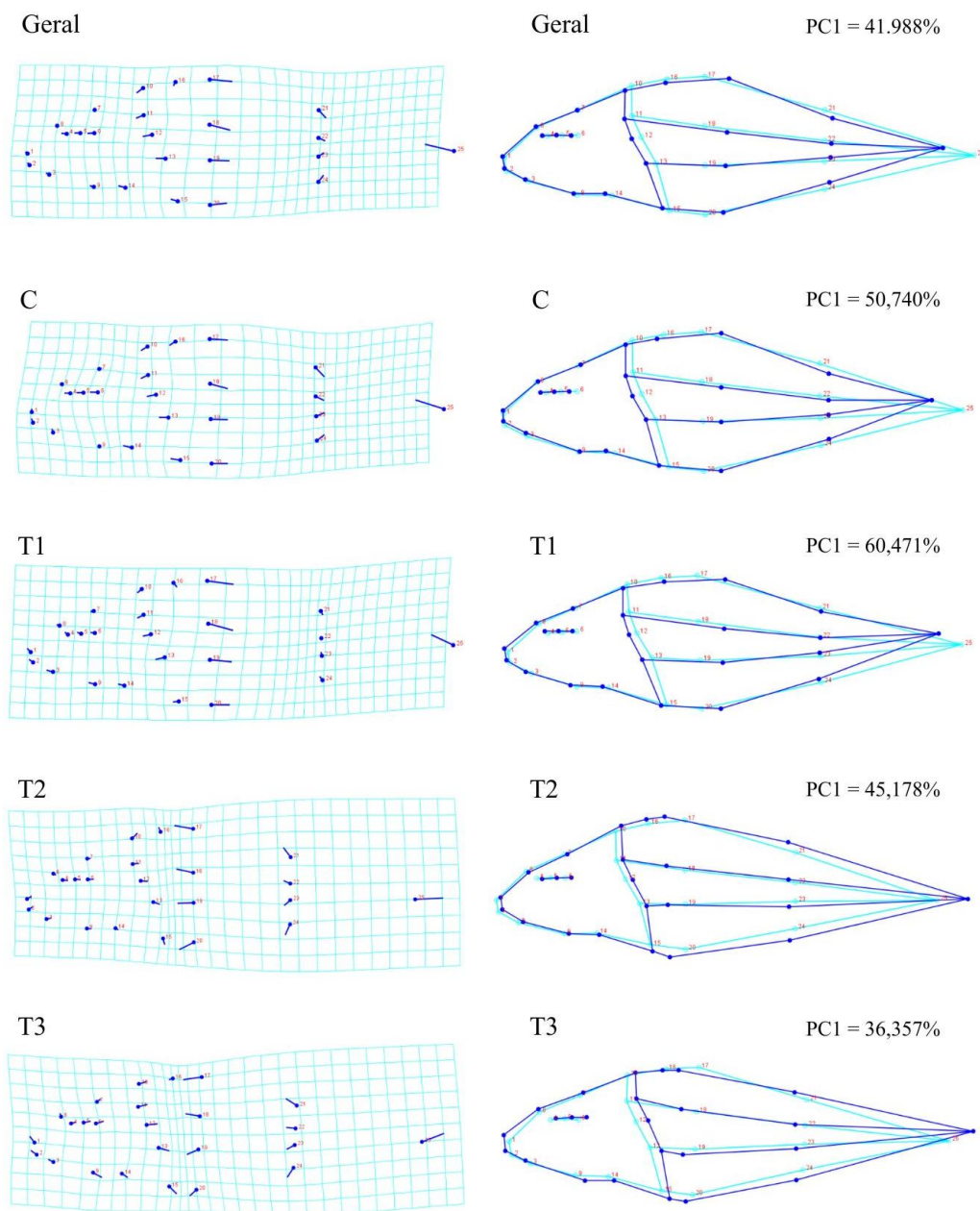
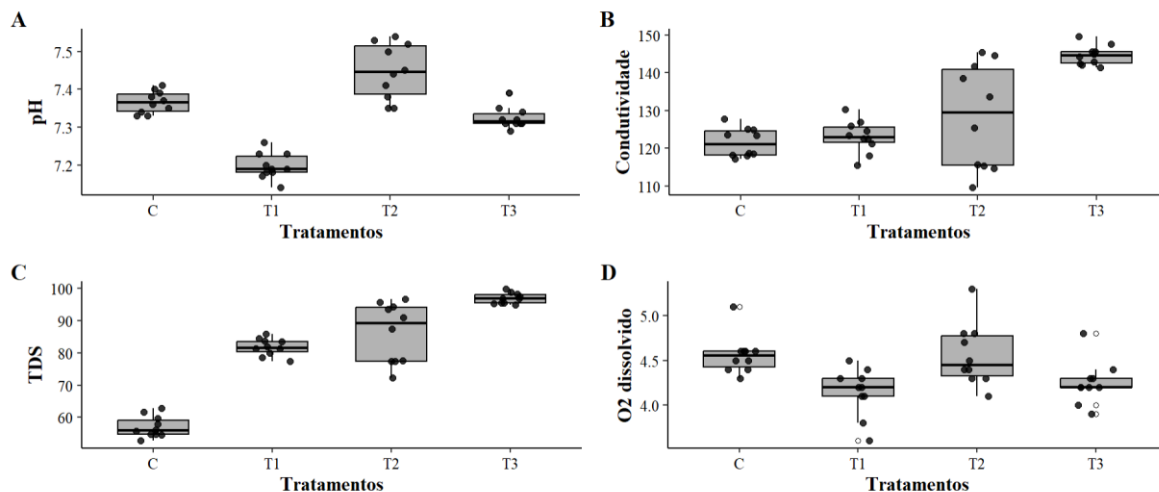


Figura - 5 Parâmetros físico-químicos da água em função dos diferentes tratamentos na exposição crônica. As barras centrais representam a mediana da distribuição do grupo, os limites das caixas correspondem aos quartis Q1 e Q3, e os bigodes indicam a variação dos dados até 1,5 vezes o intervalo interquartil. (A) representa os valores de pH, (B) condutividade, (C) TDS e (D) O₂ dissolvido.



Material suplementar

Tabela S1 – Comparações par-a-par para o pH entre os 12 grupos na exposição aguda, com os p-valores obtidas por meio do teste Tukey. Valores significativos estão sinalizados com “*”.

	C_amb	T1_amb	T2_amb	T3_amb	T4_amb	T5_amb	C_alt	T1_alt	T2_alt	T3_alt	T4_alt	T5_alt
C_amb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1_amb	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2_amb	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3_amb	0.994	0.990	0.992	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4_amb	0.971	0.956	0.964	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-
T5_amb	0.113	0.135	0.124	0.008*	0.003*	-	-	-	-	-	-	-
C_alt	1.000	1.000	1.000	0.986	0.947	0.148	-	-	-	-	-	-
T1_alt	0.999	0.999	0.999	0.748	0.586	0.503	0.999	-	-	-	-	-
T2_alt	0.999	0.999	0.999	0.909	0.796	0.303	0.999	0.999	-	-	-	-
T3_alt	0.999	0.999	0.999	0.859	0.722	0.372	0.999	1.000	1.000	-	-	-
T4_alt	1.000	1.000	1.000	0.986	0.947	0.148	1.000	0.999	0.999	0.999	-	-
T5_alt	0.423	0.476	0.449	0.052	0.027*	0.999	0.503	0.909	0.748	0.818	0.503	-

Tabela - S2 Comparações par-a-par para condutividade entre os 12 grupos na exposição aguda, com os p-valores obtidas por meio do teste Tukey. Valores significativos estão sinalizados com “*”.

	C_amb	T1_amb	T2_amb	T3_amb	T4_amb	T5_amb	C_alt	T1_alt	T2_alt	T3_alt	T4_alt	T5_alt
C_amb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1_amb	0.981	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2_amb	0.994	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3_amb	0.999	0.999	0.999	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4_amb	0.999	0.684	0.791	0.966	-	-	-	-	-	-	-	-
T5_amb	1.000	0.991	0.998	0.999	0.998	-	-	-	-	-	-	-
C_alt	0.080	0.003*	0.005*	0.019*	0.358	0.060	-	-	-	-	-	-
T1_alt	0.094	0.003*	0.006*	0.023*	0.399	0.071	1.000	-	-	-	-	-
T2_alt	0.393	0.029	0.045*	0.137	0.857	0.324	0.999	0.999	-	-	-	-
T3_alt	0.057	0.002*	0.003*	0.013*	0.282	0.042*	1.000	1.000	0.997	-	-	-
T4_alt	0.350	0.024*	0.037*	0.117	0.821	0.286	0.999	0.999	1.000	0.998	-	-
T5_alt	0.001*	0.00003*	0.00005*	0.0002*	0.011*	0.0009*	0.921	0.897	0.458	0.958	0.507	-

Tabela – S3 Comparações par-a-par para TDS entre os 12 grupos na exposição aguda, com os p-valores obtidas por meio do teste Tukey. Valores significativos estão sinalizados com “*”.

	C_amb	T1_amb	T2_amb	T3_amb	T4_amb	T5_amb	C_alt	T1_alt	T2_alt	T3_alt	T4_alt	T5_alt
C_amb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1_amb	0.988	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2_amb	0.993	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3_amb	0.999	0.999	0.999	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4_amb	0.999	0.775	0.824	0.983	-	-	-	-	-	-	-	-
T5_amb	1.000	0.998	0.999	1.000	0.997	-	-	-	-	-	-	-
C_alt	0.100	0.005*	0.006*	0.027*	0.370	0.051	-	-	-	-	-	-
T1_alt	0.133	0.007*	0.009*	0.038*	0.450	0.070*	1.000	-	-	-	-	-
T2_alt	0.434	0.041*	0.051*	0.172	0.852	0.273	0.999	0.999	-	-	-	-
T3_alt	0.065	0.002*	0.003*	0.017*	0.271	0.032*	1.000	1.000	0.997	-	-	-
T4_alt	0.424	0.039*	0.049*	0.166	0.845	0.265	0.999	0.999	1.000	0.997	-	-
T5_alt	0.002*	0.00008*	0.0001*	0.0005*	0.018*	0.001*	0.958	0.925	0.572	0.985	0.583	-

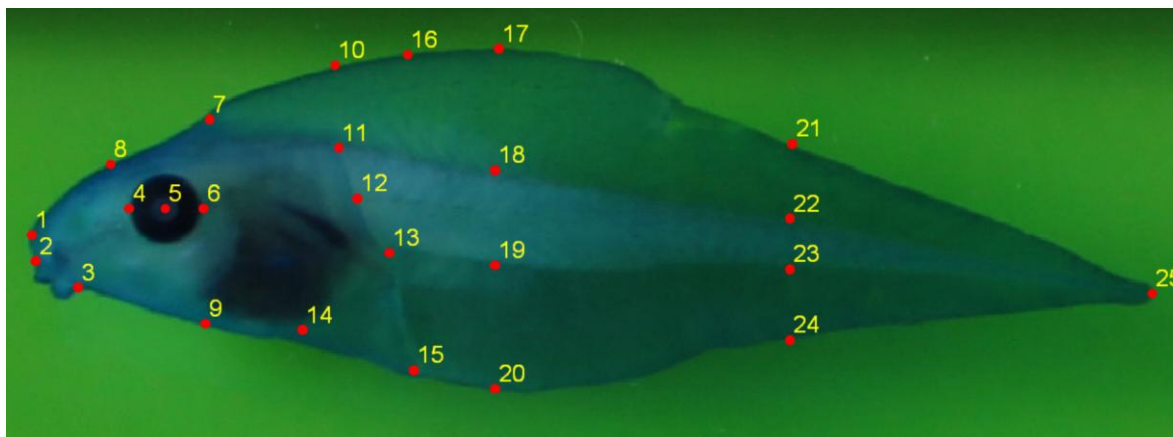
Tabela – S4 Comparações par-a-par para O₂ dissolvido entre os 12 grupos na exposição aguda, com os p-valores obtidas por meio do teste Tukey. Valores significativos estão sinalizados com “*”.

	C_amb	T1_amb	T2_amb	T3_amb	T4_amb	T5_amb	C_alt	T1_alt	T2_alt	T3_alt	T4_alt	T5_alt
C_amb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1_amb	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2_amb	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3_amb	0.232	0.126	0.126	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4_amb	0.587	0.390	0.390	0.999	-	-	-	-	-	-	-	-
T5_amb	0.918	0.982	0.982	0.005*	0.029*	-	-	-	-	-	-	-
C_alt	0.998	0.999	0.999	0.029*	0.126	0.999	-	-	-	-	-	-
T1_alt	0.999	0.993	0.993	0.687	0.958	0.486	0.858	-	-	-	-	-
T2_alt	0.126	0.063	0.063	1.000	0.998	0.002*	0.013*	0.486	-	-	-	-
T3_alt	0.918	0.780	0.780	0.982	0.999	0.126	0.390	0.999	0.918	-	-	-
T4_alt	0.232	0.126	0.126	1.000	0.999	0.005	0.029*	0.687	1.000	0.982	-	-
T5_alt	0.780	0.587	0.587	0.998	1.000	0.063	0.232	0.993	0.982	1.000	0.998	-

Tabela – S5 Comparações par-a-par para os parâmetros físico-químicos nos 4 grupos na exposição crônica, os valores significativos estão representados por “*”.

pH				
	C	T1	T2	T3
C	-	-	-	-
T1	<0.001*	-	-	-
T2	0.888	<0.001*	-	-
T3	0.597	0.146	0.011*	-
Condutividade				
	C	T1	T2	T3
C	-	-	-	-
T1	1.000	-	-	-
T2	1.000	1.000	-	-
T3	<0.001*	0.001*	0.014*	-
TDS				
	C	T1	T2	T3
C	-	-	-	-
T1	0.049*	-	-	-
T2	0.006*	1.000	-	-
T3	<0.001*	0.019*	0.117	-
O ₂ dissolvido				
	C	T1	T2	T3
C	-	-	-	-
T1	0.009*	-	-	-
T2	1.000	0.009*	-	-
T3	0.071*	0.846	0.071*	-

Figura S1 – Posição dos *landmarks* em vista lateral em girinos de *Scinax fuscovarius*



Descrição dos *Landmarks* em vista lateral *Scinax fuscovarius*

1. Extremidade anterior do focinho.
2. Ponto anterior do tubo oral visto de perfil.
3. Ponto posterior do tubo oral visto de perfil.
4. Borda anterior da íris, localizada em uma linha horizontal que passa pelo centro do olho.
5. Centro da pupila.
6. Borda posterior da íris, localizada em uma linha horizontal que passa pelo centro do olho.
7. Ponto onde a nadadeira caudal dorsal se une à parte superior do corpo.
8. Ponto central entre os landmarks 1 e 7, representando a curvatura do focinho.
9. Borda ventral do corpo, diretamente abaixo do landmark 7.
10. Ângulo de emergência da nadadeira dorsal, paralelo à interseção entre a borda dorsal do músculo caudal e o corpo (landmark 11).
11. Interseção entre a borda dorsal do músculo caudal e o corpo.
12. Interseção entre a notocorda e o corpo.
13. Interseção entre a borda ventral do músculo caudal e o corpo.
14. Interseção entre o ponto terminal do corpo e a extremidade anterior do tubo anal.
15. Extremidade posterior do tubo anal.
16. Borda dorsal da nadadeira caudal, diretamente abaixo do landmark 15.
17. Ponto mais alto da borda dorsal da nadadeira caudal.

18. Borda dorsal do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 17.
19. Borda ventral do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 17.
20. Borda ventral da nadadeira caudal, diretamente abaixo do landmark 17.
21. Borda dorsal da nadadeira caudal localizada no ponto médio entre os landmarks 17 e 25.
22. Borda dorsal do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 21.
23. Borda ventral do músculo caudal, diretamente abaixo do landmark 21.
24. Borda ventral da nadadeira caudal, diretamente abaixo do landmark 21.
25. Extremidade da cauda.

CONCLUSÃO GERAL

De forma geral, os resultados desta dissertação demonstram que a exposição ao cobre afeta a sobrevivência de girinos de *Boana faber* (Capítulo 1) e *Scinax fuscovarius* (Capítulo 2), confirmando a sensibilidade da fase larval destas espécies de anfíbios. Além disso, a avaliação em conjunto da contaminação por cobre e da temperatura indicou que, nas condições testadas, o aumento da temperatura não modulou de forma consistente os efeitos letais do cobre sobre os girinos (Capítulo 2). Esse resultado sugere que, embora a temperatura seja reconhecida como um fator modulador de processos fisiológicos, sua influência pode depender do intervalo térmico, do tempo de exposição, da espécie avaliada e dos diferentes contextos ecológicos em que a espécie está inserida. Assim, os efeitos combinados entre contaminação por metais e o aumento da temperatura não devem ser generalizados, reforçando a necessidade de abordagens experimentais específicas.

Embora a exposição crônica ao cobre tenha induzido efeitos subletais refletidos apenas em alterações morfológicas em girinos de *Boana faber* (Capítulo 1), a exposição crônica combinada do cobre com o aumento de temperatura não provocou efeitos na morfologia, bem como no comportamento de *Scinax fuscovarius* (Capítulo 2). Essa divergência nas respostas destaca que os limiares para efeitos subletais podem variar entre espécies, mesmo dentro da mesma família e sob estressores semelhantes.

Em conjunto, os achados dessa dissertação ampliam o conhecimento sobre a toxicidade do cobre em girinos de espécies tropicais, fornecendo informações relevantes que podem contribuir com a construção de curvas de sensibilidade de espécies mais robustas e avaliações de risco ecológico mais realistas. Além disso, os resultados também podem contribuir com a definição de critérios de qualidade da água mais adequados para a proteção de anfíbios no Brasil, uma vez que os critérios são embasados em espécies modelo que não refletem a realidade dos ecossistemas aquáticos tropicais. Por fim, destaca a necessidade de novos estudos que considerem de forma integrada a exposição a metais e diferentes variáveis ambientais, visando compreender como essas interações afetam espécies tropicais.