



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gustavo Kirsch

**CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR CINZAS DE INCÊNDIOS AFETA A
MORFOLOGIA DO FÍGADO E HISTÓRIA DE VIDA DE GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Florianópolis,
2024

Gustavo Kirsch

**CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR CINZAS DE INCÊNDIOS AFETA A
MORFOLOGIA DO FÍGADO E HISTÓRIA DE VIDA DE GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro Ciências Biológicas do Campus Florianópolis da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado(a) em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Bruno Renaly Souza Figueiredo, Dr.
Coorientador(a): Prof.(a) Evelise Maria Nazari, Dr.(a)

Florianópolis

2024

Kirsch, Gustavo

Contaminação da água por cinzas de incêndios afeta a morfologia do fígado e história de vida de girinos de rã-touro. / Gustavo Kirsch ; orientador, Bruno Renaly Souza Figueiredo, coorientador, Evelise Maria Nazari, 2024.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

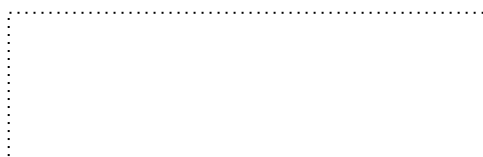
1. Ciências Biológicas. 2. Ecologia do fogo. 3.
Ecotoxicologia aquática. 4. Histopatologia do fígado. 5.
Anfíbios. I. Figueiredo, Bruno Renaly Souza. II. Nazari,
Evelise Maria. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Gustavo Kirsch

CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR CINZAS DE INCÊNDIOS AFETA A MORFOLOGIA DO FÍGADO E HISTÓRIA DE VIDA DE GIRINOS DE RÃ-TOURO

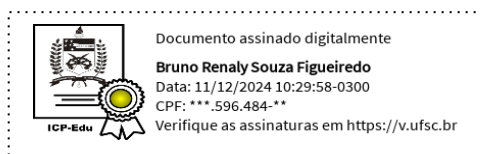
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de licenciado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 06 de dezembro de 2024.



Coordenação do Curso

Banca examinadora

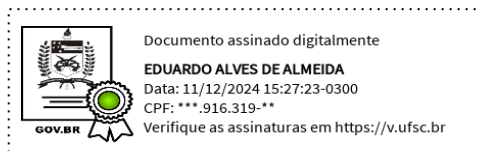


Prof. Bruno Renaly Souza Figueiredo, Dr.

Orientador

Prof. Nelson José Cabaços Abrantes, Dr.

Universidade de Aveiro



Prof. Eduardo Alves de Almeida, Dr.

Fundação Universidade Regional de Blumenau

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho àqueles que me apoiaram durante a graduação,
especialmente aos meus pais, Giane e Joel.

AGRADECIMENTOS

Sou grato à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde pude aprender com excelentes profissionais, conhecer pessoas diversas e ocupar espaços que nunca imaginei ocupar. Especificamente, quero agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade de atuar como bolsista de Iniciação Científica durante a graduação e pelo apoio financeiro proporcionado. Agradeço também às técnicas Karla e Mitie, do Laboratório Multiusuário de Ecologia (UFSC), pelo conhecimento compartilhado, pela ajuda e pelas conversas que tivemos ao longo da graduação, especialmente durante a condução dos meus experimentos. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e às técnicas Elis e Carla Letícia, pelos ensinamentos e pela ajuda durante as análises histológicas deste estudo. Por último, mas não menos importante, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) por viabilizar a realização desta pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno, que ao longo desta jornada acadêmica se tornou um grande amigo e companheiro. Sua postura como professor e pesquisador é um exemplo para mim. Obrigado por confiar a mim funções e tarefas que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente, e por compartilhar momentos especiais dentro e fora do laboratório. Nos cinco anos em que estive sob sua orientação, fui capaz de me apaixonar pela ciência e entender sua importância. Agradeço por priorizar minha orientação mesmo nos dias mais atarefados e por estar sempre disponível para meus desabafos e conversas. À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Evelise, que, embora tenha entrado recentemente em minha jornada, proporcionou valiosas discussões e conhecimentos em tão pouco tempo. O título de coorientação sempre foi apenas um termo burocrático em nossa relação, pois seus esforços e dedicação com este trabalho nunca foram coadjuvantes. Obrigado por abrir as portas do seu laboratório para mim (e para os meus girinos) e por me apresentar o “colorido mundo” da histologia. Espero que estas breves palavras consigam expressar a profunda gratidão que sinto por ambos.

Ao Laboratório de Biodiversidade Aquática da UFSC, minha segunda casa em Floripa, e a seus membros, obrigado por todas as experiências que vocês me proporcionaram. Quando digo todas, me refiro aos eternos cafezinhos no laboratório, às mais distintas conversas ao redor da nossa mesa de estudos, às dificuldades enfrentadas em conjunto durante as pesquisas, aos nossos *happy hours*, comemorações, e tantas outras experiências. É quase impossível colocar em palavras tudo o que aprendi com o laboratório e com as pessoas ali presentes. Quero

agradecer especialmente à Ronnilda, por todo o cuidado e carinho comigo, além da amizade que construímos ao longo do tempo. Você foi fundamental para a condução desta pesquisa e para minha formação pessoal. À Amanda, obrigado por compartilhar essa jornada de formação comigo. Sinto que, sem sua presença, esse período teria sido muito mais difícil. Você e sua personalidade tornaram esses últimos anos únicos, seja através das nossas reclamações conjuntas, das nossas recompensas pós expedientes, ou pelo seu ombro amigo sempre disponível. Ao Diogo, obrigado por estar presente durante a condução desta pesquisa e por ser alguém com quem sempre posso contar. Finalmente, agradeço aos membros Fabi, Larissa, Kety, Marco, Petterson, João, Felipe, Bethânia, Laise, Igor e Eduardo pelos laços que compartilhamos como amigos e membros do laboratório.

Ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal da UFSC e seus membros, obrigado por me acolherem tão bem durante os últimos dois anos. Agradeço especialmente à doutora Nathália, que foi a primeira pessoa do laboratório a me acompanhar durante os experimentos, ensinando técnicas essenciais para a condução deste trabalho. Vou sempre guardar na memória seu jeito carinhoso e alegre de ensinar. Ao doutor Madson, obrigado por acompanhar de perto esta pesquisa e por sempre estar disponível para tirar dúvidas e me ajudar em diferentes momentos. Aprendi e continuo aprendendo muito com sua experiência como pesquisador. Aos membros Paulo, Maria, Daphine, Michelle, Nerveson, Maico e Aline, sou grato pelos momentos que compartilhamos.

Às minhas amigas Larissa e Giorgia, o apoio e a amizade de vocês antes e durante a graduação foram fundamentais para que eu chegasse onde estou hoje. Quero agradecer a todos os amigos que fiz durante o curso, especialmente a Beatriz, Isabela e Leonardo, por me acolherem em Florianópolis e por estarem comigo desde o início desta jornada até hoje. A Adriane, Bianca, Gabriela e João, obrigado por me agraciarem com sua amizade. A dedicação de vocês em suas áreas de estudo sempre foi uma fonte de motivação e inspiração para mim. Finalmente, a Alli, Isabela, Laura, Luiza, Marie, Thaís e Vitória, amigas que, mesmo de longe, fizeram toda a diferença durante esse período, muito obrigado.

À minha amada família, especialmente aos meus pais, que tornaram tudo isso possível, meus mais sinceros agradecimentos. Obrigado por entenderem meu desejo de buscar essa formação em outra cidade e, por consequência, minha ausência em alguns momentos. Mãe, obrigado por toda a educação, amor, compreensão e dedicação que você tem comigo. Pai, obrigado por demonstrar seu carinho, mesmo à distância. À minha tia Gislaine, obrigado por cuidar de mim como uma segunda mãe durante todos esses anos.

*If tomorrow you and I;
If we have to say goodbye;
Remember memories never die;
Keep inside the box of time.*

— Ning Yizhuo, *That Summer When We Graduated*

RESUMO

Incêndios são uma preocupação para a conservação dos ecossistemas, pois eles resultam na perda de biodiversidade de plantas e animais, e sua ocorrência tem aumentado nos últimos anos no mundo todo, como reflexo das alterações climáticas. As cinzas são geradas como resíduo dos incêndios e podem ser transportadas para os ambientes aquáticos por ventos e chuvas. A informação sobre os impactos das cinzas sobre a biota aquática é limitada, em especial sobre os anfíbios, um dos grupos biológicos mais ameaçados de extinção. O presente estudo investigou o impacto da contaminação da água por cinzas de incêndios sobre a mortalidade, o desenvolvimento, a massa corporal, o comprimento e o fígado de girinos de *Aquarana catesbeiana*, após exposições aguda (96 horas) à 0, 2, 4, 8, 16 e 32 g/L de cinzas e crônica (16 dias) à 0, 0,69, 1,38 e 2,07 g/L de cinzas. As análises químicas demonstraram que as cinzas são ricas em metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e quando solubilizadas na água, elevam o pH e diminuem os níveis de oxigênio dissolvido. A sobrevivência dos girinos em exposição aguda foi fortemente afetada pelas cinzas na água, sendo que a concentração de cinzas letal capaz de levar 50% dos girinos à morte (CL₅₀) foi de 6,90 g/L. Embora o estágio de desenvolvimento dos girinos não tenha sido afetado pelas cinzas em exposição crônica, observou-se uma redução de 14,81% na massa corporal e de 7,32% no comprimento dos girinos comparando o início e o fim da exposição. Ainda em exposição crônica, houve 35,71% mais melanomacrófagos no fígado exposto à 1,38 g/L de cinzas e a área de vacúolos nos hepatócitos de girinos expostos às cinzas foi elevada em todas as concentrações em comparação ao grupo controle. Essas evidências sugerem que a contaminação da água por concentrações elevadas de cinzas representa grande risco à sobrevivência de populações de anfíbios em áreas sujeitas a fogo. Ainda, mesmo em concentrações subletais, as cinzas foram tóxicas para os organismos expostos, comprometendo a saúde do fígado e a história de vida dos girinos de *A. catesbeiana*. Através da avaliação da toxicidade das cinzas, o presente estudo evidenciou a importância do controle da ocorrência de incêndios, e da contaminação de ecossistemas por cinzas, com vistas para a conservação da biota aquática e dos recursos hídricos.

Palavras-chave: Ecologia do fogo; Ecotoxicologia aquática; Histopatologia do fígado; Espécies invasoras; Anfíbios.

ABSTRACT

Fires are a concern for ecosystem conservation, as they result in the loss of plant and animal biodiversity, and their occurrence has increased worldwide in recent years due to climate change. Ashes are generated from fires and can be transported to aquatic environments by wind or rain. Information on the impacts of ashes on aquatic biota is limited, particularly concerning amphibians, one of the most threatened biological groups. This study investigated the impact of ash-contaminated water on the mortality, development, body mass, length, and liver of *Aquarana catesbeiana* tadpoles after acute (96h) exposure to 0, 2, 4, 8, 16, and 32 g/L of ash and chronic (16-day) exposure to 0, 0.69, 1.38, and 2.07 g/L of ash. Chemical analyses showed that the ashes are rich in metals and polycyclic aromatic hydrocarbons, and when dissolved in water, they increase the pH and decrease dissolved oxygen levels. Tadpole survival under acute exposure was strongly affected by the ash in water, with a lethal concentration that caused 50% mortality (LC50) of 6.90 g/L. Although tadpole developmental stages were not affected by ash during chronic exposure, a 14.81% reduction in body mass and a 7.32% reduction in length were observed when comparing the beginning and end of exposure. Additionally, under chronic exposure, there was a 35.71% increase in melanomacrophages in the liver exposed to 1.38 g/L of ash, and the vacuole area in hepatocytes of tadpoles exposed to ash was elevated at all concentrations compared to the control group. These findings suggest that water contamination with high ash concentrations poses a significant risk to the survival of amphibian populations in fire-prone areas. Moreover, even at sublethal concentrations, ash was toxic to exposed organisms, compromising liver health and the life history of *A. catesbeiana* tadpoles. By assessing ash toxicity, this study highlighted the importance of controlling fire occurrences and the contamination of ecosystems by ash for the conservation of aquatic biota and water resources.

Keywords: Fire ecology; Aquatic ecotoxicology; Liver histopathology; Invasive species; Amphibians.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Materiais e etapas metodológicas conduzidas durante o trabalho: a) girinos de <i>A. catesbeiana</i> ; b) local de amostragem da vegetação para produção de cinzas; c) experimentação crônica e d) comprimentos avaliados no <i>ImageJ</i>	22
Figura 2 – Etapas da avaliação da área de hepatócitos vacuolizados após a exposição crônica de girinos de <i>A. catesbeiana</i> às cinzas. (a) Secção foto documentada; (b) imagem 8-bit; (c) seleção das áreas pela ferramenta threshold do <i>ImageJ</i> ; (d) área em pixels quantificada.....	24
Figura 3 – Valores de pH (a) e oxigênio dissolvido (b) em água contaminada por concentrações subletais de cinzas (0, 0,69, 1,38 e 2,07 g/L) em diferentes períodos de exposição (pré-exposição, inicial e final).....	28
Figura 4 – Curvas de sobrevivência (a) e concentração letal média (CL50) (b) para girinos de <i>A. catesbeiana</i> em exposição aguda a concentrações letais de cinzas.....	30
Figura 5 – Frequência relativa de girinos de <i>A. catesbeiana</i> entre os diferentes estágios de seu desenvolvimento larval (Gosner, 1960) expostos a concentrações subletais de cinzas.....	33
Figura 6 – Valores de massa corporal, comprimento corporal, caudal e total dos girinos de <i>A. catesbeiana</i> entre diferentes tempos de exposição (a, b, c, d) e expostos a concentrações subletais de cinzas (e, f, g, h).....	35
Figura 7 – Secções representativas do fígado de <i>A. catesbeiana</i> corado com HE. (a) Controle: melanomacrófagos (MM) distribuídos entre hepatócitos (setas pretas); (b) 0,69 g/L de cinzas: presença de melanomacrófagos e vacuolização dos hepatócitos (cabeça de seta); (c) 1,38 g/L de cinzas: alta frequência de melanomacrófagos, vacuolização dos hepatócitos e infiltrados de células sanguíneas (*); (d) 2,07 g/L de cinzas: vacuolização dos hepatócitos e vasos sanguíneos congestionados (C); (e) Detalhe em inserto demonstrando o centro de melanomacrófagos (CMM) em 2,07 g/L de cinzas; (f) Relação entre o número de melanomacrófagos e concentrações subletais de cinzas; (g) Razão da área ocupada por hepatócitos vacuolizados entre diferentes concentrações de cinzas. Barra de escala = 50 µm.	37
Figura 8 – Temperatura (°C) das unidades experimentais contaminadas por concentrações subletais de cinzas (0, 0,69, 1,38 e 2,07 g/L) em diferentes períodos de exposição	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de elementos inorgânicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de cinzas oriundas da queima de biomassa vegetal	26
Tabela 2 – Valores dos parâmetros físicos e químicos da água em exposição aguda (96 horas) às cinzas de incêndios florestais	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CMM	Centro de melanomacrófagos
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GLM	Modelos lineares generalizados (do inglês, <i>Generalized linear model</i>)
GQA	Grupo de Química Ambiental
HE	Hematoxilina-Eosina
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry</i>)
IPCC	do inglês, <i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit of quantification</i>)
MM	Melanomacrófagos
OD	Oxigênio dissolvido
T	Temperatura
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO GERAL	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	ESPÉCIE UTILIZADA	18
3.2	COLETA DE MATERIAL VEGETAL E PRODUÇÃO DE CINZAS	19
3.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CINZAS	19
3.4	EXPERIMENTO 1: TOXICIDADE AGUDA	20
3.5	EXPERIMENTO 2: TOXICIDADE CRÔNICA	21
3.6	ANÁLISES HISTOLÓGICAS: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E MICROTOMIA	22
3.7	ANÁLISES HISTOLÓGICAS: COLORAÇÃO E ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	23
3.8	ANÁLISES DE DADOS	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CINZAS	25
4.2	PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA	28
4.3	SOBREVIVÊNCIA	29
4.4	BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS	32
4.5	BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS	36
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE A	46
	APÊNDICE B	47

1 INTRODUÇÃO

Incêndio florestal é o fogo que ocorre de maneira não controlada e não planejada sobre a vegetação, seja ela nativa ou plantada, em áreas rurais, independentemente da fonte de ignição (Brasil, 2024). Mesmo em biomas historicamente caracterizadas por alta umidade e precipitação anual elevadas, como a Mata Atlântica, a ocorrência de incêndios florestais tem sido observada (Cochrane, 2003; Sansevero *et al.*, 2020). O aumento no registro da ocorrência de incêndios florestais nesses locais e nos últimos anos, é reflexo da ação humana quanto ao desmatamento e uso do fogo para supressão vegetal (Alencar *et al.*, 2015; Brando *et al.*, 2014). Agravando ainda mais esse cenário, alterações climáticas globais têm afetado a regularidade das chuvas, concentrando-as em períodos curtos, ocasionando períodos de seca prolongados e ondas de calor em muitas partes do mundo (IPCC, 2023; Marengo *et al.*, 2021). Com mais dias quentes e secos ocorre um aumento na quantidade de biomassa vegetal seca, a qual pode atuar como combustível para incêndios florestais, tornando a relação entre ocorrência de incêndios florestais e as mudanças climáticas cada vez mais estrita (Harris *et al.*, 2016; Westerling *et al.*, 2011).

A combustão parcial da biomassa vegetal produz cinzas, material particulado constituído por diferentes elementos tóxicos, tais como metais, metaloides e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Nunes *et al.*, 2017; Oo *et al.*, 2021). Essa composição pode variar de acordo com as espécies vegetais queimadas (Santos *et al.*, 2023b) e o regime de fogo (Sánchez-García *et al.*, 2023). Portanto, para determinar a toxicidade das cinzas sobre os organismos, é necessário também reconhecer a sua composição química. As cinzas ameaçam os recursos hídricos e a biodiversidade de ecossistemas aquáticos, pois o vento e as chuvas podem carregá-las para esses sistemas (Martinelli; Filoso, 2008; Santín *et al.*, 2015). O aporte de cinzas na água impacta as condições abióticas de sistemas aquáticos em diferentes escalas (Harper *et al.*, 2019; Kwan *et al.*, 2024; Sánchez-García *et al.*, 2023), incluindo alterações nas condições de oxigênio dissolvido e pH em ambientes aquáticos temporários (McDonald *et al.*, 2018), como poças de água, que podem servir como habitat para diferentes espécies de anfíbios.

Na água, parte das cinzas se solubiliza, e causa relevante mortalidade sobre os organismos aquáticos (Brito *et al.*, 2017; Gonino *et al.*, 2019b; Ré *et al.*, 2021). Além dos impactos letais, pesquisas demonstram que menores concentrações de cinzas de incêndios causam impactos subletais, que comprometem o desenvolvimento e diversos aspectos da história de vida dos seres vivos. Por exemplo, Ré *et al.* (2021) mostraram elevada frequência de danos celulares em peixes habitando cursos de água afetados por cinzas. A imobilização de

dafnídeos foi fortemente afetada em exposição aguda às cinzas de incêndios (Brito *et al.*, 2017). Gonino *et al.* (2019b) relataram uma diminuição na atividade de descanso, no comportamento de busca e na ousadia do peixe *Luciobarbus bocagei* comparados à peixes não expostos às cinzas. A reprodução de animais também pode ser afetada pela contaminação da água por cinzas, especificamente, (Oliveira-Filho *et al.*, 2018) relataram uma diminuição no número de ovos produzidos por *Biomphalaria glabrata* expostos às cinzas.

Entre os vertebrados aquáticos, os anfíbios são os mais ameaçados pelo risco de extinção (Luedtke *et al.*, 2023). Apesar dessa ameaça, é incipiente o número de investigações que avaliam respostas de biomarcadores em anfíbios expostos à contaminação da água por cinzas, menos ainda, são os focados em entender os efeitos das cinzas sobre estágios larvais do desenvolvimento de anuros. Há evidências demonstrando que a ocorrência de incêndios florestais e exposição às cinzas reduz a sobrevivência, o comprimento e o peso de girinos de *Pelophylax perezi* (Santos *et al.*, 2023b). Além disso, em exposição às cinzas de incêndios, um atraso no desenvolvimento de embriões e girinos de *Xenopus laevis* já foi evidenciado (Santos *et al.*, 2023a). Finalmente, estudos encontraram variações na comunidade microbiana da pele (Coelho *et al.*, 2022) e intestino (Dong *et al.*, 2024) de *Rana iberica* e *Rana dybowskii* expostas às cinzas, demonstrando que a relação entre indivíduo e as microbiotas intestinal e cutânea de anfíbios também pode ser afetada pela contaminação da água após incêndios. A toxicidade de cinzas oriundas de outras fontes, como a combustão de carvão, também está descrita na literatura, com estudos demonstrando que girinos de *Aquarana catesbeiana* em locais contaminados apresentam deformidades nas papilas orais, reduzem seu consumo de alimento e apresentam comportamento natatório alterado após a exposição (Christopher *et al.*, 1996; Raimondo; Rowe; Congdon, 1998)

Aquarana catesbeiana Shaw, 1802, espécie popularmente conhecida como rã-touro, tem sido amplamente utilizada como um modelo animal em estudos ecotoxicológicos (Christopher *et al.*, 1996; Grott *et al.*, 2021; Marcantonio *et al.*, 2023; Pinto-Vidal *et al.*, 2021; Raimondo; Rowe; Congdon, 1998; Rutkoski *et al.*, 2022). *A. catesbeiana* é nativa da América do Norte, apresenta maturidade sexual precoce (1 a 2 anos após metamorfose), extenso período reprodutivo (6 a 7 meses) e alta fecundidade (até 25 mil ovos em uma desova) (Filho *et al.*, 1998; Kaefer; Boelter; Cechin, 2007). Essas características reprodutivas, tornam *A. catesbeiana* uma espécie de elevado interesse para o cultivo animal. A soma dessas características sexuais ao interesse econômico na espécie levou à introdução de populações exóticas em diversos países, incluindo o Brasil (Both *et al.*, 2011). Sabe-se que a ocorrência de *A. catesbeiana* está associada a alterações na abundância e diversidade de outras populações de anuros (Hecnar;

M'Closkey, 1997; Li *et al.*, 2011), e a dispersão de fungos patogênicos (*Batrachochytrium dendrobatidis*) para anfíbios (Schloegel *et al.*, 2010). Nos ambientes onde *A. catesbeiana* é introduzida, a espécie é considerada uma forte competidora com espécies nativas, tanto em sua fase adulta quanto larval (Silva *et al.*, 2009). De modo geral, o desenvolvimento de anfíbios pode ser classificado em períodos distintos: embrionário (G1-G24), larval/girino (G25-G41) e metamórfico (G42-G46) (Gosner, 1960). No estágio G25, os girinos já apresentam uma boca funcional e iniciam sua alimentação de maneira independente (Gosner, 1960) (Figura 1a). A partir desse estágio, os girinos são frequentemente utilizados para realizar ensaios ecotoxicológicos. Em relação a *A. catesbeiana*, seus girinos têm hábitos alimentares generalistas (Quiroga *et al.*, 2022) e alimentam-se principalmente na coluna de água, tornando-os suscetíveis à ingestão de cinzas, em ambientes aquáticos situados em áreas sujeitas a incêndios.

O fígado desempenha um papel essencial no metabolismo e na manutenção da homeostase de animais vertebrados, pois este órgão atua na reserva e distribuição de macronutrientes, na decomposição de células sanguíneas, e na detoxificação do organismo (Bechmann *et al.*, 2012; Karami-Mohajeri; Abdollahi, 2011; Rui, 2014). O tecido hepático é composto principalmente por hepatócitos, células de formato poliédrico, com um ou dois núcleos e citoplasma eosinófilo (Junqueira; Carneiro, 2013). Os hepatócitos desempenham funções endócrinas e exócrinas, são capazes de sintetizar proteínas e acumular, detoxificar e transportar substâncias (Junqueira; Carneiro, 2013). Além dos hepatócitos, os melanomacrófagos, isto é, macrófagos pigmentados devido ao alto teor de lipofuscina, melanina e hemossiderina, estão presentes no fígado de anfíbios (Steinel; Bolnick, 2017), onde exercem relevante função no seu sistema de defesa (Fenoglio *et al.*, 2005; Franco-Belussi; De Oliveira, 2016). Diante do papel central do fígado em diversas funções metabólicas, alterações nas células do tecido hepático de anfíbios expostos a condições ambientais adversas, como a contaminação da água por cinzas, podem ser utilizadas como biomarcadores para avaliação do impacto de poluentes aquáticos sobre populações de anuros.

Em virtude da alta ocorrência de incêndios florestais e das cinzas gerados por esse distúrbio, ensaios ecotoxicológicos com girinos de *A. catesbeiana* foram conduzidos no presente estudo para compreender os efeitos da contaminação dos ambientes aquáticos por cinzas sobre a biota. Considerando a toxicidade das cinzas já demonstrada para anfíbios em estágio larval (Santos *et al.*, 2023a; Santos *et al.*, 2023b), e o efeito das cinzas sobre variáveis abióticas de ambientes aquáticos (Harper *et al.*, 2019; Kwan *et al.*, 2024; McDonald *et al.*, 2018; Sánchez-García *et al.*, 2023), no presente estudo foram testadas as seguintes hipóteses:

(1) as cinzas de incêndios são ricas em metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e alteram parâmetros físicos e químicos da água após contaminação; (2) em concentrações letais e subletais a sobrevivência, biomarcadores morfológicos e histológicos de *A. catesbeiana* serão negativamente impactados pela exposição às cinzas. Os resultados dessa pesquisa revelaram o grau de ameaça da biodiversidade aquática, particularmente anfíbios, pela contaminação da água por cinzas geradas por incêndios florestais.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os impactos da contaminação da água por cinzas de incêndios florestais, através da sua caracterização química e efeitos sobre parâmetros abióticos e bióticos de ecossistemas aquáticos, com foco na toxicidade das cinzas para girinos de *Aquarana catesbeiana*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e quantificar os elementos inorgânicos e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes nas cinzas.
- Verificar se a contaminação da água por cinzas altera seus parâmetros físicos e químicos.
- Estimar a concentração letal média (CL₅₀) de cinzas para girinos de *A. catesbeiana*, em exposição aguda (96 horas) às cinzas.
- Avaliar se a exposição crônica (16 dias) em concentrações subletais de cinzas afeta o ritmo de desenvolvimento e biometrias corporais dos girinos expostos.
- Testar se a exposição às cinzas afeta o número de melanomacrófagos e a área de hepatócitos vacuolizados no fígado de girinos em exposição crônica as concentrações subletais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIE UTILIZADA

No presente estudo, girinos de *A. catesbeiana* foram adquiridos em uma ranicultura, transportados até a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em sacos plásticos aerados preenchidos com água e aclimatados por sete dias no Laboratório de Biodiversidade Aquática as condições experimentais. No início dos experimentos, todos os girinos encontravam-se no estágio G25, pesavam em média 3,35 g ($\pm 0,68$) e possuíam 31,95 mm ($\pm 4,10$) de comprimento total. A manipulação dos girinos nos ensaios ecotoxicológicos deste trabalho possui a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (protocolo nº 6564170323) e respeita o princípio dos 3R's (redução, substituição e refinamento) no uso de animais na ciência.

3.2 COLETA DE MATERIAL VEGETAL E PRODUÇÃO DE CINZAS

Limitações logísticas impediram a amostragem de cinzas após incêndios florestais, e as cinzas utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da queima de vegetação típica de campos de altitude do Parque Nacional de São Joaquim Nacional (Figura 1b), Urubici, Santa Catarina (28°10'22"S, 49°35'57"W). Nesta área, os proprietários locais têm tradicionalmente utilizado o fogo para promover o brotamento de vegetação campestre e impedir a expansão da floresta (Sühs *et al.*, 2021). Para produção das cinzas em queima controlada, realizou-se amostragem da vegetação mais abundante nos campos de altitude, especificamente, gramíneas, ervas e arbustos representados em sua maioria pelas famílias Poaceae, Asteraceae e Cyperaceae (Casali, 2023). O material coletado foi seco ao sol. As cinzas foram produzidas por combustão incompleta em sistema aberto, sem limitação de oxigênio, utilizando cerca de 2 kg de biomassa vegetal seca a uma temperatura média de 300°C. Nesse procedimento, as chamas duraram aproximadamente cinco minutos, simulando incêndios florestais de baixa a moderada intensidade, cuja ocorrência é mais comum que a de incêndios severos (Certini, 2005). Essas características de combustão resultaram em cinzas negras, ricas em compostos orgânicos (Certini, 2005), o que pode aumentar sua solubilidade e facilitar a liberação de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente aquático. Por fim, as cinzas foram acondicionadas em sacos plásticos pretos e refrigerados a -6°C, na ausência de luz, para evitar atividade biológica e alterações químicas desencadeadas pela luz (Silva *et al.*, 2015).

3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CINZAS

Para avaliar a composição inorgânica das cinzas, uma amostra de 100 g do poluente foi levada ao Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da UFSC,

onde, por meio de preparação por digestão ácida, a determinação semiquantitativa dos elementos inorgânicos presentes nas cinzas foi realizada. Utilizou-se a técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), com introdução da amostra por nebulizador pneumático, para a realização do procedimento.

Adicionalmente, em colaboração com o Grupo de Química Ambiental, GQA – Universidade Federal do Paraná (UFPR), foram determinadas as concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes na amostra de cinzas oriunda da queima da biomassa vegetal, através da técnica Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). O limite de quantificação (LOQ) estabelecido para essa técnica corresponde a $<76 \text{ ng/g}^{-1}$.

3.4 EXPERIMENTO 1: TOXICIDADE AGUDA

Girinos de *A. catesbeiana* foram expostos por 96 horas à seis concentrações de cinzas: 0 (controle), 2, 4, 8, 16 e 32 g/L ($n = 16$ girinos/concentração). Para cada concentração de cinzas, duas réplicas foram avaliadas, contendo oito indivíduos em cada aquário. A exposição ocorreu em aquários de vidro retangulares (comprimento = 25 cm, largura = 20 cm, altura = 20 cm), preenchidos com 8 L de água decolorada. As concentrações do experimento foram baseadas em concentrações ambientalmente relevantes descritas na literatura (Jesus *et al.*, 2023) e ensaios pilotos não publicados. Durante o período de exposição, os organismos não foram alimentados e foram submetidos a um fotoperíodo natural (12:12 horas). A temperatura média da água nas unidades experimentais correspondia a 26°C.

A preparação das suspensões de cinzas utilizadas na experimentação foi baseada no protocolo de preparo proposto por Silva *et al.* (2015). As cinzas foram maceradas com o uso de um pistilo e almofariz, e posteriormente filtradas com uma peneira (porosidade = 2 cm). Após esses processos, as cinzas foram adicionadas a recipientes de polietileno (capacidade = 5 L) contendo 1 litro de água da torneira decolorada. As suspensões foram misturadas manualmente por agitação e despejadas nos aquários. Para a concentração de 2 g/L do experimento foram adicionados 16 gramas do macerado de cinzas no aquário, de modo que, ao final da preparação, a concentração de cinzas na suspensão correspondia a 2 gramas de cinzas em cada litro de água do aquário. O mesmo processo foi realizado para as demais concentrações de cinzas (4, 8, 16 e 32 g/L), alterando apenas a quantidade de cinzas a ser adicionada, cujo os valores foram de, respectivamente 32, 64, 128 e 256 gramas de cinzas.

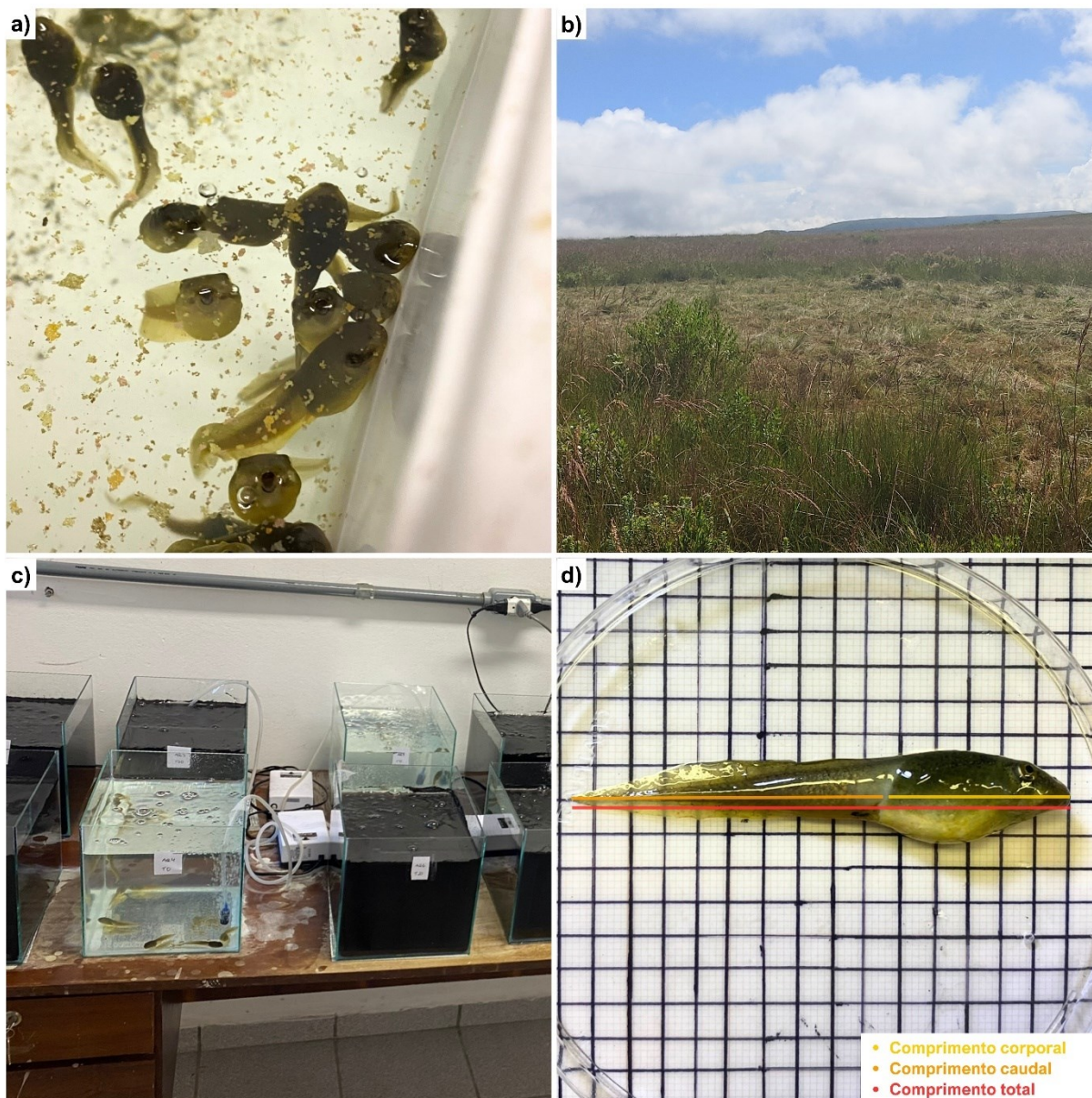
O ensaio de toxicidade aguda foi conduzido a fim de obter: (1) uma curva de sobrevivência para *A. catesbeiana* e (2) a concentração de cinzas necessária para levar 50% da população exposta à morte (CL_{50}). A mortalidade foi contabilizada a cada 24 horas, e caracterizada pela ausência de resposta a estímulos externos e/ou flutuabilidade do organismo na superfície da água. Os organismos que sobreviveram aos quatro dias de exposição foram eutanasiados por imersão em recipientes plásticos, contendo uma solução de 6 g de lidocaína para cada 1 L de água (Galex *et al.*, 2020). A temperatura da água ($^{\circ}C$), o pH e o oxigênio dissolvido (mg/L) foram mensurados em todas as réplicas no início do experimento e registrados a cada 24 horas após a adição das cinzas, para avaliar potenciais alterações decorrentes da solubilização de cinzas e do tempo de exposição (APÊNDICE A).

3.5 EXPERIMENTO 2: TOXICIDADE CRÔNICA

Girinos de *A. catesbeiana* em estágio G25 foram expostos a concentrações subletais de cinzas (0 (controle), 0,69, 1,38 e 2,07 g/L) durante 16 dias ($n = 28$ girinos/concentração), caracterizando uma exposição crônica, período que compreende todo o tempo de desenvolvimento larval do girino (Gosner, 1960). Essas concentrações representam, respectivamente, ambientes sem cinzas e 10%, 20% e 30% do valor de CL_{50} obtido a partir do experimento 1. Os girinos foram expostos em 16 unidades experimentais, com as mesmas dimensões descritas no experimento 1. As unidades experimentais foram replicadas quatro vezes em cada concentração e sete girinos foram adicionados a cada um dos aquários, totalizando 112 indivíduos expostos (Figura 1c). Durante o período de exposição às cinzas, os girinos foram alimentados com 15 g de ração para peixes (Alcon Basic) a cada 48 horas. A limpeza das excretas e/ou restos de comida nos aquários animais foi realizada com o auxílio de um sifão a cada 48 horas. A temperatura da água ($^{\circ}C$), o pH, e a concentração de oxigênio dissolvido (mg/L), foram mensurados e registrados previamente à exposição, e a cada 96 horas após a adição das cinzas, para avaliar potenciais alterações decorrente da solubilização de cinzas e do tempo de exposição.

O estágio de desenvolvimento dos girinos foi caracterizado ao fim dos 16 dias de exposição. A massa corporal (g) dos organismos foi mensurada com o uso de uma balança de precisão, enquanto que o comprimento corporal (do focinho até a cauda), caudal e total (mm) dos animais, foi aferido através de fotografias analisadas no software *ImageJ* (Figura 1d). Ambas as biometrias corporais foram avaliadas previamente à exposição às cinzas e ao final da experimentação.

Figura 1. Materiais e etapas metodológicas conduzidas durante o trabalho: a) girinos de *A. catesbeiana*; b) local de amostragem da vegetação para produção de cinzas; c) experimentação crônica e d) comprimentos avaliados no *ImageJ*.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E MICROTOMIA

Ao fim da exposição crônica, os girinos foram amostrados aleatoriamente para as análises histológicas ($n = 6$ girinos/concentração). A eutanásia foi conduzida com lidocaína (6 g/L) e os girinos foram fixados em formaldeído a 4% por 6 horas. Ao final desse período, as caudas dos girinos foram removidas no plano dorsoventral e a região anterior do corpo permaneceu por mais 18 horas em formaldeído a 4%, totalizando 24 horas de fixação. Após, os

girinos foram transferidos para etanol a 70%, permanecendo até o início do processo de inclusão dos tecidos.

Os fígados dos girinos foram dissecados e desidratados em série crescente de banhos de álcool: 70%, 80%, 90%, 100% I e 100% II (1 hora em média para cada concentração). Posteriormente, os fígados foram diafanizados em xilol, infiltrados com parafina (3 horas, 60°C) e emblocados a temperatura ambiente. Os blocos foram seccionados (6 µm) com o uso de um micrótomo rotativo (Olympus CUT 2020^a) e as secções dispostas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. As secções do fígado nas lâminas foram organizadas em linhas e colunas. Cada linha representava um fígado, de modo que um fígado para cada concentração de cinzas foi seccionado na mesma lâmina (total = 4 linhas/lâmina). Entre as linhas, quatro colunas foram dispostas, contendo secções do fígado em quatro alturas diferentes (total = 16 secções/lâmina). Seguindo essa organização, foram preparados 6 conjuntos de lâminas (10 lâminas cada), e as mesmas submetidas a diferentes análises histológicas.

3.7 ANÁLISES HISTOLÓGICAS: COLORAÇÃO E ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.

Para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), uma lâmina de cada conjunto foi desparafinizada em dois banhos de xilol puro (2 minutos em cada banho) e reidratadas em série decrescente de etanol (100% - 70% de 2,5 minutos em média para cada concentração). As lâminas foram lavadas com água corrente (5 minutos) e em seguida imersas em hematoxilina (1 minuto e 15 segundos). As lâminas foram novamente lavadas em água corrente (4 minutos), depois imersas em eosina (35 segundos) e, finalmente, lavadas em água destilada (4 minutos). Após a coloração, as lâminas foram desidratadas em uma série crescente de banhos de etanol (70% - 100% de 2,5 minutos em média para cada concentração). As lâminas foram banhadas duas vezes em xilol puro (2 minutos em cada banho) e finalizadas com lamínula e Entellan®.

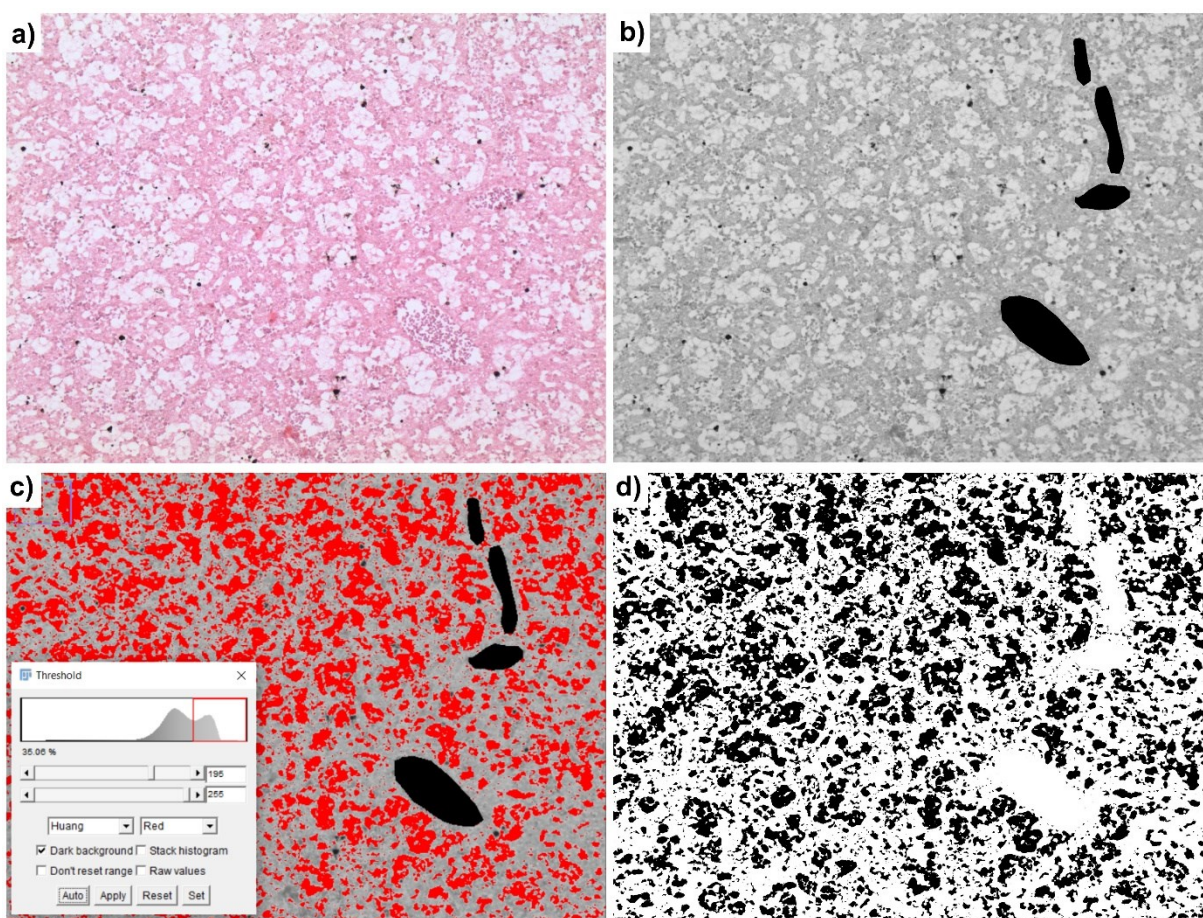
Utilizando as lâminas histológicas de secções de fígado coradas com HE, o número de melanomacrófagos nas secções de cada concentração foi avaliado. Em cada secção foram considerados 5 campos visuais (central, superior esquerdo e direito, e inferior esquerdo e direito), delimitados em um aumento de 400 X do Microscópio de Luz (Microscópio Olympus CX22LED). Para análise da área ocupada por vacúolos nos hepatócitos dos girinos, as mesmas lâminas foram foto documentadas utilizando uma câmera acoplada a um microscópio em um aumento de 100 X (Microscópio Olympus BX 41 - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, LAMEB). As fotos obtidas foram convertidas em imagens de 8-bit, e analisadas com o software *ImageJ* através da ferramenta *threshold*, que permitia a seleção da área ocupada por células vacuolizadas e quantificava o número de pixels nessa área determinada (adaptado de

Rivero-Wendt *et al.*, 2023). Nessa análise, o lúmen de grandes vasos e outras regiões que não formavam o tecido hepático foram excluídas (Figura 2). Uma vez obtidos os valores brutos da área ocupada por células vacuolizadas em cada secção, uma razão dessa alteração entre as secções de cada concentração foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Razão da área ocupada por células vacuolizadas} = \frac{\text{Área de células vacuolizadas exposta às cinzas (pixels)}}{\text{Área de células secção controle (pixels)}}$$

Para os grupos controles, essa razão sempre correspondeu a 1, uma vez que a área bruta não alterada era fracionada por ela mesma.

Figura 2. Etapas da avaliação da área de hepatócitos vacuolizados após a exposição crônica de girinos de *A. catesbeiana* às cinzas. (a) Secção foto documentada; (b) imagem 8-bit; (c) seleção das áreas pela ferramenta *threshold* do *ImageJ*; (d) área em pixels quantificada.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.8 ANÁLISES DE DADOS

Para testar diferenças entre o pH, o oxigênio dissolvido e a temperatura da água, antes e após a adição das cinzas na água em ambas as experimentações, foram realizados modelos lineares generalizados (GLM), com família: Gaussiana, e link: *identity*. As curvas de sobrevivência dos indivíduos expostos às cinzas por 96 horas, elaboradas pelo método de Kaplan-Meier, foram comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). A concentração letal média (CL₅₀) de cinzas capaz de causar a morte de 50% da população de *A. catesbeiana* em 96 horas foi estimada através de uma regressão não-linear. Para as análises de sobrevivência e mortalidade, utilizou-se o software *GraphPad Prism* para realização dos testes, e o nível de significância estatística foi identificado por valor de $P < 0,05$. A normalidade e a homogeneidade de variância dos dados da experimentação crônica, foram avaliadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Uma vez que esses pressupostos fossem atendidos, uma Análise de Variância (ANOVA *one-way*) foi aplicada para testar se a exposição às cinzas (variável preditora com quatro níveis: 0 (controle), 0,69, 1,38 e 2,07 g/L,) altera a massa corporal e o comprimento dos girinos (variáveis respostas). Uma vez demonstrado valor significativo pelo teste de variância ($P < 0,05$), um teste *post-hoc* de Tukey foi aplicado para determinar em quais concentrações a diferença foi observada. Dados não paramétricos, como o estágio de desenvolvimento dos girinos, o número de melanomacrófagos e a área ocupada por células vacuolizadas, foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Nemenyi para comparação *post-hoc*. Todas as análises supracitadas foram feitas no software R (R Core Team, 2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CINZAS

A análise química dos elementos inorgânicos realizada por ICP-MS revelou que as amostras de cinzas são ricas em metais, sendo o Potássio (K) o metal mais abundante na amostra, seguido do Boro (B) e Magnésio (Mg) (Tabela 1). Enquanto que a análise química dos elementos orgânicos da amostra de cinzas feita por GC-MS revelou que a amostra de cinza possuiu elevada concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre os quais o fenantreno apresentou maior concentração na amostra, seguido do pireno e naftaleno (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações de elementos inorgânicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de cinzas oriundas da queima de biomassa vegetal.

Analitos	Concentração (mg/kg)	Concentração (ng/g)
K	91123	-
B	52621	-
Mg	25387	-
Al	9446	-
Fe	6698	-
Na	4070	-
Mn	2651	-
Si	2295	-
Ca	1843	-
Ti	654	-
Rb	202	-
Fenantreno	-	2.144
Pireno	-	1.863
Fluoranteno	-	653
Fluoreno	-	463
Antraceno	-	371
Criseno	-	305
Benzo[a]antraceno	-	142
Benzo[b]fluoranteno	-	<76
Benzo[k]fluoranteno	-	<76
Benzo[a]pireno	-	<76
Indeno[1,2,3-cd]pireno	-	<76
Dibenz[a,h]antraceno	-	<76
Benzo[ghi]perileno	-	<76
Acenaftileno	-	<33
Acenafteno	-	<33

Fonte: Elaborado pelo Laboratório de Espectrometria Atômica / Departamento de Química (UFSC) e Grupo de Química Ambiental, GQA (UFPR).

Há uma ampla variedade de elementos que constituem as cinzas, e que podem estar presentes em diferentes quantidades (Nunes *et al.*, 2017; Oo *et al.*, 2021; Sánchez-García *et al.*, 2023). Elementos encontrados em concentrações elevadas nas amostras de cinzas do presente estudo, como boro (B = 52621 mg/kg) e magnésio (Mg = 25387 mg/kg), também foram encontrados em amostras de cinzas geradas por incêndios no Cerrado brasileiro (Harper *et al.*, 2019), variando entre 1 - 85 mg/kg para boro e 26 - 3067 mg/kg para magnésio, as quais mostraram-se tóxicas para *Daphnia magna*. Com exceção de potássio (K) e magnésio (Mg), os metais mais abundantes nas amostras de cinzas foram alumínio (Al) e ferro (Fe), o que corrobora as pesquisas anteriores que sugerem que esses metais são abundantes nas cinzas (Brito *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019). Embora, pouca quantidade de cálcio (Ca) tenha sido detectada na análise deste estudo, esse metal é frequentemente relatado como um elemento abundante entre os diferentes tipos de cinzas (Sánchez-García *et al.*, 2023).

A riqueza de elementos encontrados nas cinzas pode explicar sua toxicidade em organismos, no entanto, é importante também considerar a concentração desses elementos nas cinzas para inferir sobre sua toxicidade em animais. Por exemplo, Coelho *et al.* (2022) relataram efeito mais pronunciado sobre a microbiota cutânea de *R. iberica* expostas às cinzas geradas por incêndios de grande severidade, que apresentavam maiores concentrações de elementos como manganês (Mg = 3,6 mg/L), zinco (Zn = 1,4 mg/L) e cobre (Cu = 1,2 mg/L) nas cinzas, comparado a incêndios de baixa severidade. Por fim, a semelhança entre constituintes das cinzas deste experimento, com os elementos encontrados nas cinzas de estudos que caracterizam o poluente *in situ*, permite que através dos resultados experimentais sejam feitas inferências sobre a toxicidade das cinzas de incêndios florestais para girinos no ambiente.

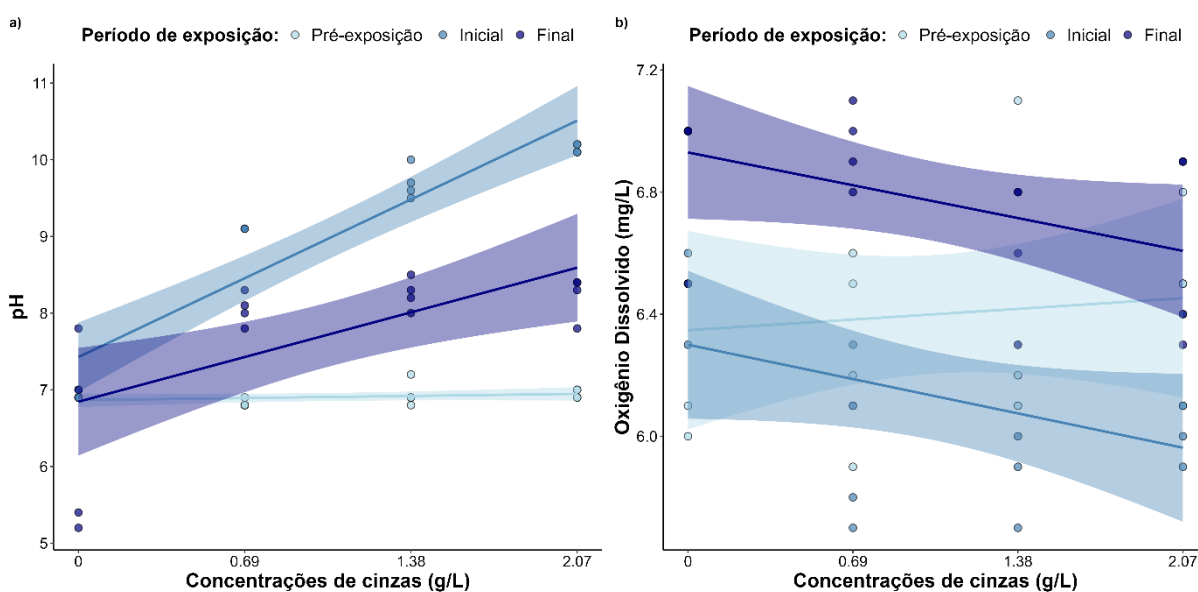
As cinzas também possuem em sua composição hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que podem conferir maior toxicidade as cinzas. O risco à saúde da biota, conferido pela toxicidade dos HPAs, bem como suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas são reconhecidos em diferentes trabalhos (Abdel-Shafy; Mansour, 2016; Campos *et al.*, 2012; Caumo *et al.*, 2022). Especificamente, Bhuyan *et al.*, 2020 demonstram que girinos de *Euphlyctis cyanophlyctis* expostos a concentrações subletais de fenantreno (0,12, 0,61 e 1,22 mg/L) tiveram respostas genotóxicas e alteram parâmetros de estresse oxidativo, como um aumento da atividade de superóxido dismutase e indução da peroxidação lipídica. Similarmente, uma redução na sobrevivência, atraso no desenvolvimento e alterações no sistema de defesa antioxidante foram observadas em girinos de *Fejervarya limnocharis* expostos à pireno (0,08 mg/L) e antraceno (0,42 mg/L) fotoativados (Paul *et al.*, 2024). Tanto fenantreno, quanto pireno e antraceno fazem parte da composição das cinzas testadas na

presente experimentação, o que pode ajudar a explicar as alterações biológicas observadas nos girinos de *A. catesbeiana* deste trabalho.

4.2 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

Houve um considerável aumento no pH da água após a adição de cinzas ($8,97 \pm 1,28$), em comparação com os valores médios de pH antes da exposição ($6,91 \pm 0,10$), seguido de uma leve diminuição ($7,72 \pm 1,01$) ao fim dos 16 dias de exposição ($gl = 2$; $\chi^2 = 38,71$; $P < 0,001$). Quanto maior a concentração de cinzas, maior é o aumento nos valores de pH observados ($gl = 3$; $\chi^2 = 18,43$; $P < 0,001$) (Figura 3a). Por outro lado, a concentração de oxigênio dissolvido na água (Figura 3b) em pré-exposição às cinzas ($6,4 \pm 0,35$ mg/L) difere dos valores do início ($6,13 \pm 0,29$ mg/L) e do final ($6,77 \pm 0,26$ mg/L) do período de exposição ($gl = 2$; $\chi^2 = 35,21$; $P < 0,001$). Entretanto, os valores de oxigênio dissolvido não variaram entre as diferentes concentrações de cinzas ($gl = 3$; $\chi^2 = 2,43$; $P = 0,48$). Por fim, a temperatura da água variou levemente entre o período de exposição (ANEXO B), isto é, no início ($25,3 \pm 0,08^\circ\text{C}$) e ao final ($23,8 \pm 0,07^\circ\text{C}$) dos 16 dias de exposição às cinzas ($gl = 2$; $\chi^2 = 2346,5$; $P < 0,001$). No entanto, uma variação significativa não foi encontrada entre os tratamentos ($gl = 3$; $\chi^2 = 0,05$; $P = 0,99$).

Figura 3. Valores de pH (a) e oxigênio dissolvido (b) em água contaminada por concentrações subletais de cinzas (0, 0,69, 1,38 e 2,07 g/L) em diferentes períodos de exposição (pré-exposição, inicial e final).



Fonte: elaborado pelo autor.

Embora seja difícil determinar exatamente quais reações químicas estejam ocorrendo entre os elementos que compõem as cinzas e aqueles dissolvidos na água, que promoveram as alterações nos parâmetros físicos e químicos testados, é provável que a ligação entre íons H^+ e O^{2-} disponíveis no meio com cátions e ânions liberados durante a solubilização das cinzas seja fundamental para explicar a elevação do pH na água (devido à redução na concentração de íons H^+) e a diminuição nos níveis de oxigênio dissolvido (devido à redução na concentração de íons O^{2-}) (Kwan *et al.*, 2024). O potencial tóxico das cinzas pode estar relacionado as variações nos valores de pH da água, como demonstrado por Harper *et al.* (2019), para imobilização de *D. magna*. Isso ocorre porque o pH em sistemas aquáticos é capaz de influenciar a biodisponibilidade e a dissolução dos elementos que compõem as cinzas na água (Franklin *et al.*, 2000; Karlfeldt Fedje *et al.*, 2010) e, consequentemente, sua toxicidade.

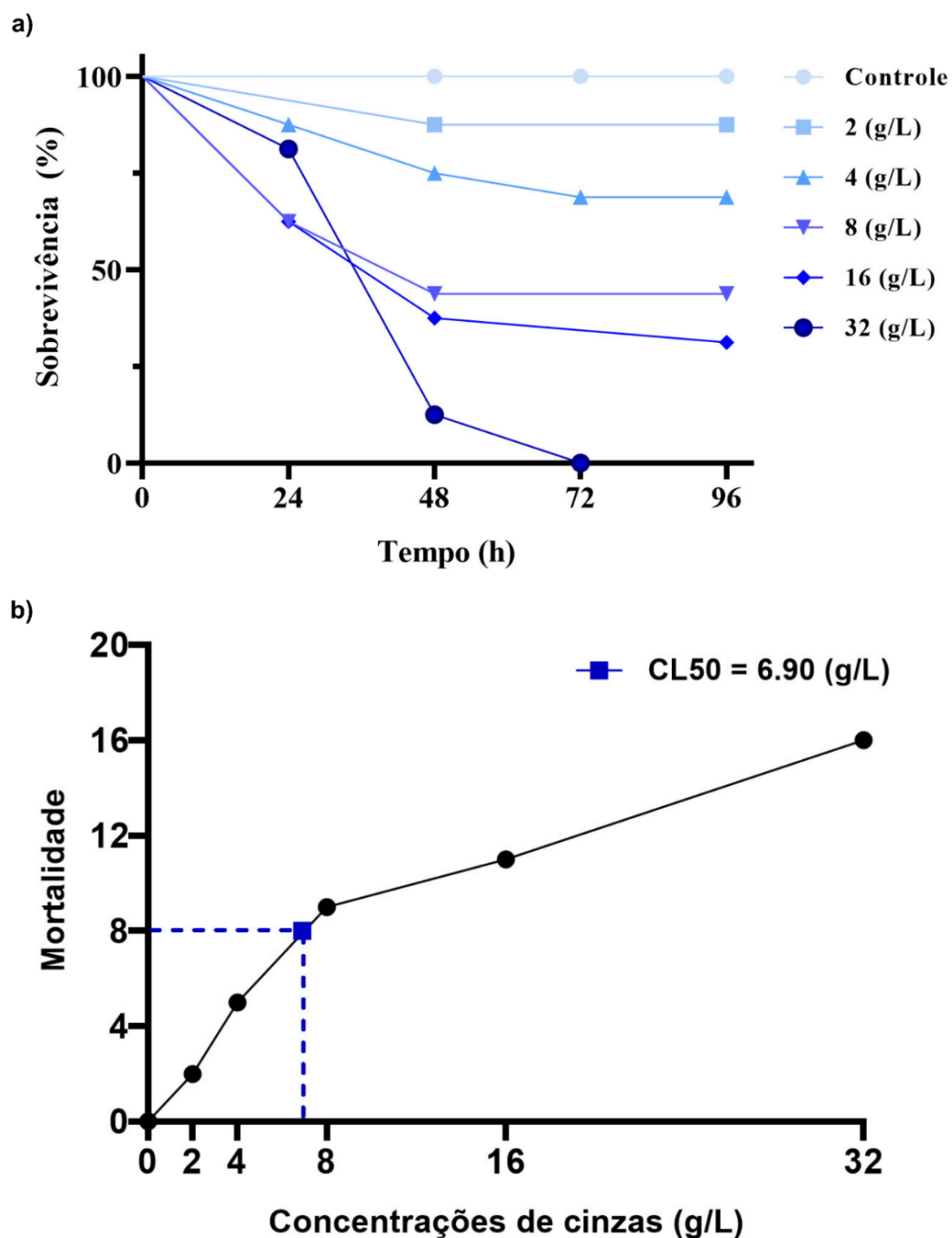
Em mesocosmos, McDonald *et al.* (2018) observaram que poças contaminadas por serrapilheira queimada apresentavam valores de pH e oxigênio dissolvido mais elevados do que as não contaminadas. Adicionalmente, nas poças contaminadas, a aptidão dos girinos de *Hyla chrysoscelis* foi afetada, com indivíduos apresentando menor massa corporal, comprimento reduzido e atraso no desenvolvimento dos membros (McDonald *et al.*, 2018). A partir desses resultados, pode-se sugerir que variações nos parâmetros físicos e químicos da água, como a alcalinização e a redução do oxigênio dissolvido, alteram a química dos constituintes das cinzas solubilizados na água, criando um ambiente estressante para os girinos e contribuindo para seus efeitos tóxicos. No entanto, em uma amostra tão complexa quanto a do presente estudo, é difícil afirmar quais elementos específicos estariam envolvidos nessa toxicidade.

4.3 SOBREVIVÊNCIA

A sobrevivência dos girinos ao longo do primeiro experimento, diminuiu significativamente após a contaminação da água por cinzas ($gl = 5$, $\chi^2 = 42,74$; $P < 0,001$). A porcentagem de sobreviventes entre as concentrações (0, 2, 4, 8, 16, e 32 g/L) correspondeu a, respectivamente, 100%, 87,5%; 68,75%, 43,75%, 31,25% e 00,0%. Os sinais clínicos apresentados pelos girinos antes de morrer foram a perda da capacidade natatória, subsequente a perda do equilíbrio e ausência de resposta a estímulo externo. Um aumento no número de mortos dependente do aumento das concentrações letais de cinzas foi demonstrado após 24 e 48 horas de exposição as cinzas (Figura 4a). O ensaio de toxicidade aguda para cinzas após 96 horas indicou que a menor probabilidade de sobrevivência dos girinos ocorreu na maior concentração de cinzas testada (32 g/L) e na concentração de 16 g/L, a partir das 24 horas em

ambos os casos. A concentração letal média (CL₅₀) de cinzas estimada para a população de girinos exposta por 96 horas (Figura 4b) foi de, aproximadamente, 6,90 g/L de cinzas (gl = 4, $\chi^2 = 0,9014$) com um intervalo de confiança 95% = [3,74; 12,62 g/L].

Figura 4. Curvas de sobrevivência (a) e concentração letal média (CL₅₀) (b) para girinos de *A. catesbeiana* em exposição aguda a concentrações letais de cinzas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados do presente estudo mostraram um claro aumento na mortalidade de *A. catesbeiana* em elevadas concentrações de cinzas. Esse padrão de resposta também é observado em outros estudos, como em Dong *et al.* (2023), que utilizando cinzas geradas pela queima da palha de arroz, demonstraram que a taxa de sobrevivência de *R. dybowskii* pode ser reduzida a 60% em exposição crônica (30 dias) à 10 gramas de cinzas por litro. De forma semelhante, uma mortalidade significativa foi descrita (Santos *et al.*, 2023b) para girinos de *P. perezi* expostos à uma diluição de 76,9% de extrato aquoso (10 g/L) produzido com cinzas residuais da queima de *Eucalyptus globulus*. A toxicidade das cinzas geradas pela queima de *E. globulus* e *Pinus pinaste* também foi testada em embriões e girinos de *X. laevis*, e embora tenham causado uma mortalidade relativamente grande (20 a 30%) dos organismos nos diferentes estágios de desenvolvimento, a mesma não diferiu do controle (Santos *et al.*, 2023a). Apesar dos trabalhos citados corroborarem o efeito das cinzas sobre a mortalidade de *A. catesbeiana* observada neste estudo, é difícil identificar os fatores específicos responsáveis por afetar a sobrevivência de girinos expostos às cinzas, uma vez que não se conhecem todos os potenciais efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos dos elementos químicos das cinzas para a biota, bem como, a possível combinação desses efeitos com o estresse ambiental gerado pela alteração dos parâmetros físicos e químicos da água.

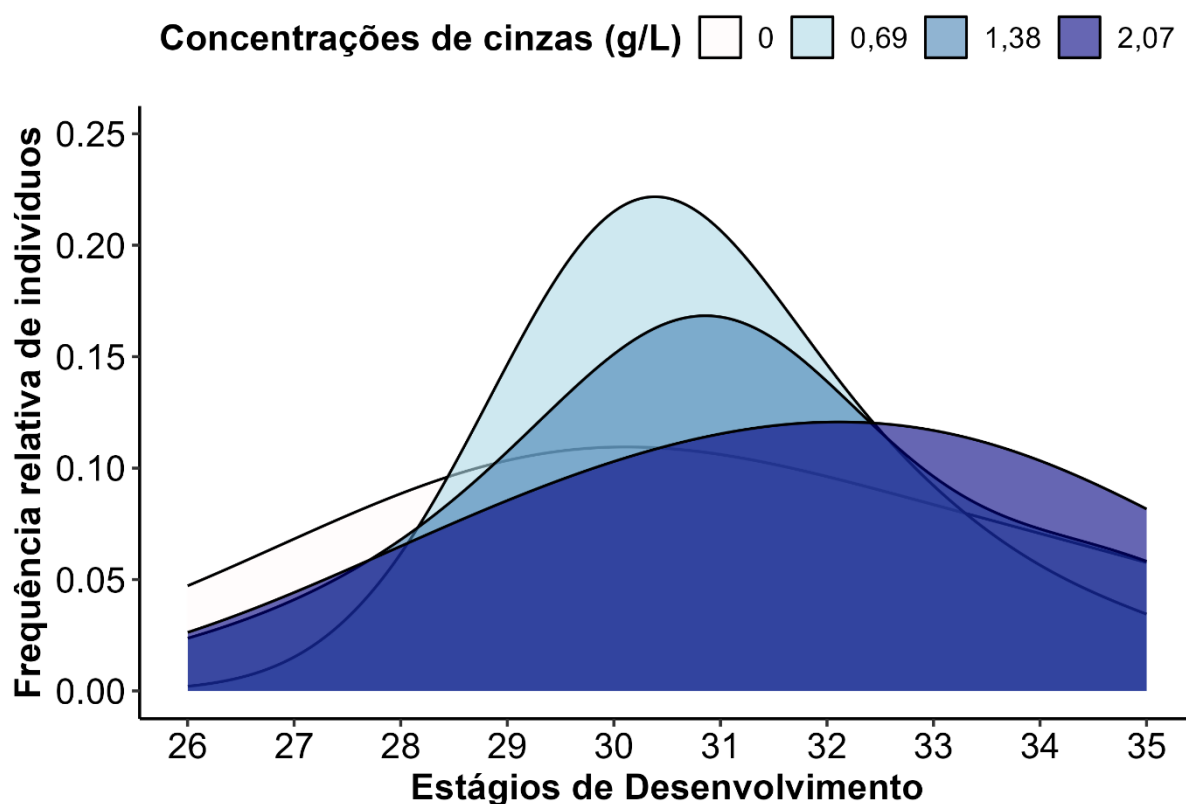
Encontrou-se que a concentração letal de cinzas capaz de levar a morte de 50% dos girinos de rã-touro corresponde a 6,90 g/L. Até onde se sabe, essa é a primeira estimativa de concentração letal de cinzas de incêndios florestais para *A. catesbeiana*. As CL₅₀ estimadas para outros vertebrados expostos às cinzas são bem variáveis em relação à concentração determinada para *A. catesbeiana* neste estudo. Por exemplo, para peixes Gonino *et al.* (2019a) encontrou uma concentração letal de 2,52 g/L para *Astyanax lacustris*, 2,12 g/L para *Moenkhausia bonita*, e 1,98 g/L para *M. forestii*, após exposição aguda (24 horas) às cinzas da queima da cana-de-açúcar. Por outro lado, em Brito *et al.* (2017), o valor estimado para a CL₅₀ de *Danio rerio* em exposição aguda às cinzas de incêndios florestais foi de 41,10 g/L em 24 horas e de 32,10 g/L em 48 horas. Essa variação entre as concentrações letais estimadas na literatura pode ser dada pelas características específicas dos organismos testados, sendo alguns mais tolerantes do que outros, ou ainda, ser resultado da origem do material que gerou as cinzas, os quais podem ter elementos tóxicos constituintes em concentrações variadas. Não apenas, o tempo de exposição ao poluente, também pode ter um efeito sobre as diferentes concentrações letais calculadas nos estudos citados. No entanto, considerando que concentrações de 10 g/L de cinzas já foram observadas em ecossistemas naturais (Jesus *et al.*, 2023), pode-se prever que a chegada de

cinzas em corpos hídricos habitados por *A. catesbeiana* ameaça seriamente a sobrevivência das populações dessa espécie.

4.4 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

O estágio de todos os girinos no início da experimentação correspondia ao estágio G25. Após os 16 dias de exposição, os estágios mais frequentemente observados entre os girinos expostos a 0, 0,69, 1,38 e 2,07 g/L de cinzas, foram respectivamente, os estágios 30 (27,27%), 31 (26,32%), 31 (41,67%) e 32 (24%). Embora a presença de girinos em estágios mais avançados na maior concentração subletal de cinzas testada (2,07 g/L) possa sugerir um avanço no desenvolvimento desses animais em resposta as cinzas (Figura 5), não foi observada diferença estatística entre a distribuição dos estágios de desenvolvimento dos girinos entre as concentrações de cinzas ($gl = 3$; $X^2 = 0,28$; $P = 0,96$). Resultados similares foram encontrados por Santos *et al.* (2023b), em ensaios com girinos de *P. perezi* expostos às cinzas de *E. globulus* e *P. pinaste*. Contrariamente, em exposição a cinzas de mesma origem, Santos *et al.* (2023a) demonstraram que embriões e girinos de *X. laevis* retardaram seu desenvolvimento em comparação à girinos no grupo controle. O contraste entre essas evidências pode sugerir que a toxicidade das cinzas em relação ao desenvolvimento de girinos é espécie dependente, sendo *A. catesbeiana*, mais tolerante ao poluente do que *X. laevis*, por exemplo. Ainda, pode sugerir que o efeito das cinzas no desenvolvimento pode ser mais pronunciado em embriões, estágio de vida que precede o estágio pré-metamórfico dos girinos nessa experimentação.

Figura 5. Frequência relativa de girinos de *A. catesbeiana* entre os diferentes estágios de seu desenvolvimento larval (Gosner, 1960) expostos a concentrações subletais de cinzas.



Fonte: elaborado pelo autor.

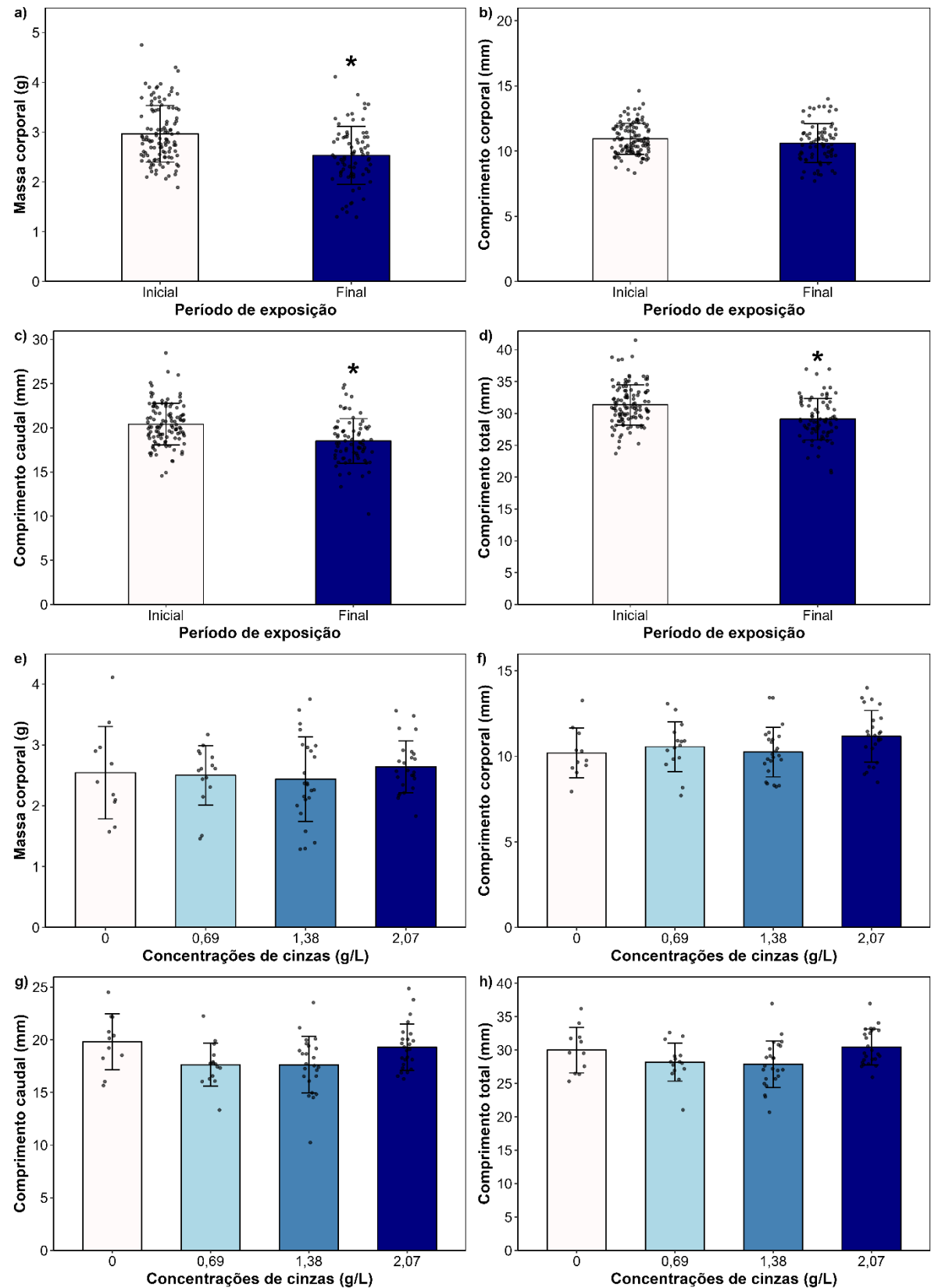
Observou-se uma diminuição significativa ($gl = 1$; $F = 25,44$; $P < 0,001$) na massa corporal dos girinos entre o início e o fim do período de exposição crônica (antes - $2,97 \text{ g} \pm 0,56$; depois - $2,53 \text{ g} \pm 0,58$; Figura 6a). No entanto, a massa corporal dos girinos não variou entre as concentrações subletais de cinzas testadas ($gl = 3$; $F = 0,49$; $P = 0,68$). O comprimento corporal dos girinos expostos não variou entre períodos de exposição ($gl = 1$; $F = 2,74$; $P = 0,09$) ou entre concentrações de cinzas ($gl = 3$; $F = 1,97$; $P = 0,12$). O comprimento caudal diminuiu significativamente ($gl = 1$; $F = 27,82$; $P < 0,001$) entre os períodos de exposição (antes - $20,4 \text{ mm} \pm 2,35$; depois - $18,5 \text{ mm} \pm 2,54$) mas não variou entre concentrações. Por fim, observou-se uma diminuição no comprimento total dos girinos ($gl = 1$; $F = 21,90$; $P < 0,001$) após a exposição às cinzas (antes - $31,4 \text{ mm} \pm 3,16$; depois - $29,1 \text{ mm} \pm 3,26$), no entanto, essa variação no tamanho total não foi encontrada entre as concentrações de cinzas testadas.

Girinos de *A. catesbeiana* expostos às cinzas de carvão apresentaram redução no número de dentes e deformações nas papilas labiais, limitando sua capacidade de alimentação (Christopher *et al.*, 1996; Raimondo; Rowe; Congdon, 1998). Ainda, em condições de pH

alcalino (8,5 – 9,8), semelhantes aos valores de pH mensurados na água contaminada por cinzas (8,97) no presente estudo, foram observadas deformidades morfológicas nos dentes, papilas labiais e mandíbula de girinos expostos (Devi *et al.*, 2016; Thabah *et al.*, 2014). Considerando as evidências mencionadas, essas respostas morfológicas também poderiam ser observadas em exposição a água contaminada por cinzas de incêndios florestais com pH alcalino, e ainda, poderiam estar associadas a redução no peso e comprimento observados nos girinos deste estudo.

Uma diminuição na massa corporal, e no comprimento de girinos expostos às cinzas de incêndios florestais já foi relatada em outros trabalhos com girinos, (Santos *et al.*, 2023a; Santos *et al.*, 2023b), no entanto, ainda são necessárias evidências que corroborem a relação entre a presença de anomalias congênitas e diminuição das biometrias corporais para cinzas de incêndios florestais. É importante mencionar que, durante a presente experimentação a quantidade de sólidos suspensos na coluna d'água causada pela contaminação das cinzas também pode ter interferido no forrageamento dos organismos expostos, o que auxiliaria a explicar a redução da massa corporal e comprimento ao fim da exposição. Independentemente dos fatores que levaram à essa redução observada nas biometrias corporais, principalmente no que diz respeito ao comprimento caudal dos girinos, essa diminuição torna-se uma grande preocupação para anuros em desenvolvimento, uma vez que a cauda de girinos é a principal fonte de energia para indivíduos em clímax metamórfico (McDiarmid; Altig, 1999).

Figura 6. Valores de massa corporal, comprimento corporal, caudal e total dos girinos de *A. catesbeiana* entre diferentes tempos de exposição (a, b, c, d) e expostos a concentrações subletais de cinzas (e, f, g, h). * representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

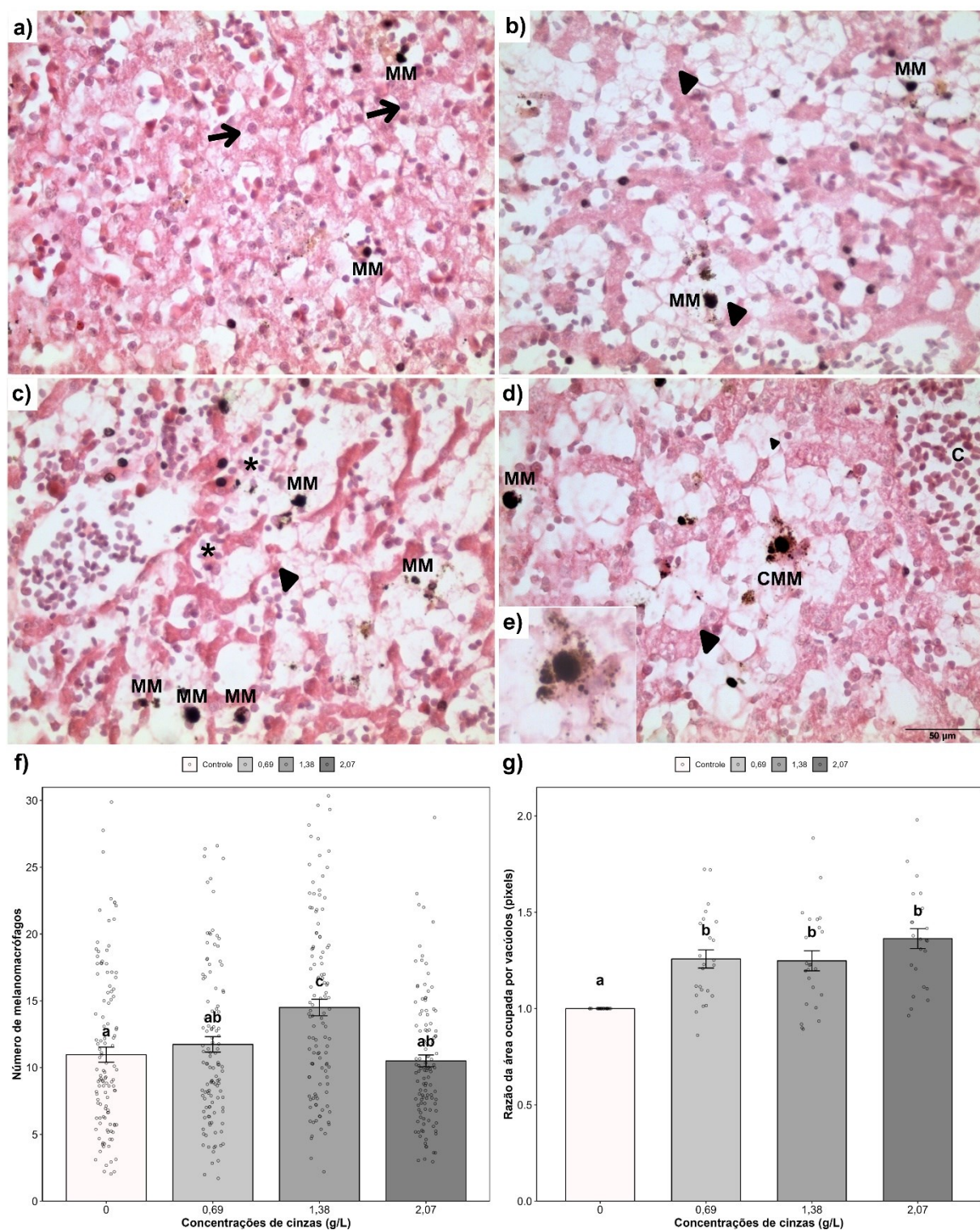


Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

No fígado dos girinos de *A. catesbeiana* no grupo controle, foi possível observar numerosos hepatócitos rodeados por capilares sinusoides, além de alguns vasos sanguíneos (Figura 7a). Embora a estrutura de cordão hepático não tenha sido tão evidente no fígado dos girinos, em nenhum dos grupos experimentais, não houve manifestações histopatológicas observadas no grupo controle. De forma contrária, no fígado dos girinos expostos às concentrações subletais testadas, danos na morfologia do tecido foram identificados. Na menor concentração (0,69 g/L), observou-se vacuolização nos hepatócitos e um aumento no espaço entre cordões hepáticos (Figura 7b). Na concentração de 1,38 g/L de cinzas, os vacúolos também eram evidentes, e o espaço entre cordões hepáticos elevado, diferindo da organização tecidual observada no grupo controle (Figura 7c). Ainda, nessa concentração, foi possível observar vasos com grande acúmulo de células mononucleares, e em algumas secções, infiltrados de células sanguíneas no tecido. Em 2,07 g/L, a concentração subletal de cinzas mais elevada, a desorganização estrutural dos hepatócitos é bem evidente, com os vacúolos nos hepatócitos se tornando mais numerosos, e com grandes espaços entre cordões hepáticos. Novamente, infiltrados de células sanguíneas foram observados na mais alta concentração (Figura 7d).

Figura 7. Secções representativas do fígado de *A. catesbeiana* corado com HE. (a) Controle: melanomacrófagos (MM) distribuídos entre hepatócitos (setas pretas); (b) 0,69 g/L de cinzas: presença de melanomacrófagos e vacuolização dos hepatócitos (cabeça de seta); (c) 1,38 g/L de cinzas: alta frequência de melanomacrófagos, vacuolização dos hepatócitos e infiltrados de células sanguíneas (*); (d) 2,07 g/L de cinzas: vacuolização dos hepatócitos e vasos sanguíneos congestionados (C); (e) Detalhe em inserto demonstrando o centro de melanomacrófagos (CMM) em 2,07 g/L de cinzas; (f) Relação entre o número de melanomacrófagos e concentrações subletais de cinzas; (g) Razão da área ocupada por hepatócitos vacuolizados entre diferentes concentrações de cinzas. Barra de escala = 50 µm.



Fonte: elaborado pelo autor.

A presença de melanomacrófagos no tecido hepático foi observada em todas as concentrações de cinzas testadas. No entanto, a quantidade de melanomacrófagos variou significativamente entre concentrações subletais de cinzas (Figura 7f; $\chi^2 = 28,78$; gl = 3, $P < 0,001$). Em comparação ao grupo controle ($11,2 \pm 6,56$) e as demais concentrações testadas, o

número de melanomacrófagos foi significativamente maior em fígados expostos à concentração de 1,38 g/L de cinzas ($15,2 \pm 7,54$; $P < 0,001$). Em 0,69 g/L de cinzas, também se observou um aumento no número dessas células ($12,1 \pm 6,91$), no entanto essa elevação não diferiu do grupo controle. Na maior concentração de cinzas testada, o número médio de melanomacrófagos foi ligeiramente menor que no grupo controle ($10,5 \pm 4,76$), todavia, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação a vacuolização dos hepatócitos, observou-se um aumento na área ocupada por células vacuolizadas no fígado de girinos de todas às concentrações subletais de cinzas testadas comparados ao grupo controle (Figura 7g; $\chi^2 = 34,88$; $gl = 3$, $P < 0,001$). O valor da razão estabelecida entre a área de hepatócitos vacuolizados e a área de tecido não alterado nos grupos controle correspondeu a 1 (px), isto é, não apresentou alterações. Nas diferentes concentrações de cinzas testadas o valor para essa razão, em média, correspondeu: a 1,26 (px) em 0,69 g/L; 1,25 (px) em 1,38 g/L e 1,36 (px) em 2,07 g/L.

Embora não haja trabalhos avaliando a toxicidade das cinzas de incêndios florestais para o fígado de girinos, até onde se tem conhecimento, as alterações histopatológicas encontradas pelo presente estudo são consistentes com estudos prévios que avaliaram a resposta deste órgão à exposição a outros poluentes, como fungicidas, herbicidas e antibióticos (Grott *et al.*, 2021; Marcantonio *et al.*, 2023; Rutkoski *et al.*, 2022). Em virtude da relação dos melanomacrófagos com o sistema antioxidante enzimático de organismos vertebrados (Fenoglio *et al.*, 2005; Steinel; Bolnick, 2017), o aumento no número dessas células no fígado pode refletir uma resposta do indivíduo para a neutralização de radicais livres gerados pelo estresse a exposição às cinzas. Ainda, essa resposta também pode expressar um mecanismo de defesa do sistema imune dos girinos, através da ação dos melanomacrófagos como transformadores de xenobióticos (Agius; Roberts, 2003).

O aumento na área ocupada por hepatócitos vacuolizados em *A. catesbeiana*, em todas as concentrações de cinzas testadas, indica uma condição de esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos dos girinos. Disfunções no metabolismo lipídico causadas pela exposição combinada a HPAs e antibióticos foram associadas à diminuição na transcrição de genes, como o *PPARGC1A*, e relacionadas à esteatose hepática, evidenciada pelo acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos de *Xenopus tropicalis* (Regnault *et al.*, 2016). Sabe-se que, em exposição a metais como lítio e cobre, girinos de *A. catesbeiana* e *Bufo gargarizans* apresentaram, respectivamente, elevada mobilização de triglicerídeos no fígado (Pinto-Vidal *et al.*, 2021) e acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos (Chai *et al.*, 2017). Embora HPAs e metais sejam substâncias amplamente encontradas nas cinzas (Nunes *et al.*, 2017; Oo *et al.*, 2021; Sánchez-García *et al.*, 2023), e sua relação com a esteatose hepática já

seja discutida na literatura (Chai *et al.*, 2017; Pinto-Vidal *et al.*, 2021; Regnault *et al.*, 2016), é difícil afirmar com precisão quais elementos e HPAs estariam especificamente relacionados ao aumento na área de hepatócitos vacuolizados no presente estudo. Diante desse contexto, novas pesquisas são necessárias para compreender totalmente a relação entre cinzas de incêndios florestais, disfunções no metabolismo de lipídios e esteatose hepática em girinos expostos às cinzas.

5 CONCLUSÃO

A contaminação da água por cinzas de incêndios florestais, ricas em metais e HPAs, impacta negativamente os ecossistemas aquáticos. O presente estudo demonstrou uma clara relação entre um aumento na mortalidade de girinos dependente de concentrações elevadas de cinzas, bem como identificou alterações na massa corporal e no comprimento de girinos expostos. Em concentrações subletais, as cinzas provocaram alterações histopatológicas no fígado de girinos, entre as quais estão, um aumento no número de melanomacrófagos e na área ocupada por hepatócitos vacuolizados, como resposta ao estresse gerado pela toxicidade das cinzas e disfunções metabólicas. Os elementos químicos (metais e HPAs) que compõem as cinzas são fatores que conferem a toxicidade do poluente. Além disso, o aporte desse poluente para corpos hídricos leva à alcalinização da água e à redução do oxigênio disponível, agravando os efeitos tóxicos observados sobre a história de vida dos animais expostos a essas condições. O conjunto de evidências apresentado neste estudo, corrobora as hipóteses testadas e demonstra a necessidade de mitigar o carreamento de cinzas de incêndios florestais em corpos de água, a fim de impedir o declínio de espécies de anfíbios em ecossistemas impactados. Adicionalmente, este estudo reforça a utilidade de biomarcadores histológicos do fígado de girinos para avaliação ecotoxicológica de poluentes ambientais sobre a biota aquática.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAIFY, Hussein I.; MANSOUR, Mona S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, [s. l.] v. 25, n. 1, p. 107–123, 2016.
- AGIUS, Charles; ROBERTS, R J. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 499–509, 2003.
- ALENCAR, Ane A. *et al.* Landscape fragmentation, severe drought, and the new Amazon forest fire regime. **Ecological Applications**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1493–1505, 2015.
- BECHMANN, Lars P. *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 952–964, 2012.
- BHUYAN, Krishna *et al.* Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, Dicroglossidae) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 20962–20971, 2020.
- BOTH, Camila *et al.* Widespread Occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. **South American Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 127–134, 2011.
- BRANDO, Paulo Monteiro *et al.* Abrupt increases in Amazonian tree mortality due to drought–fire interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 17, p. 6347–6352, 2014.
- BRASIL. **Política Nacional de Manejo Integrado do Fogo - Planalto**. 31 jul. 2024.
- BRITO, Darlan Q. *et al.* Aquatic ecotoxicity of ashes from Brazilian savanna wildfires. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 24, p. 19671–19682, 2017.
- CAMPOS, I. *et al.* Assessment of the toxicity of ash-loaded runoff from a recently burnt eucalypt plantation. **European Journal of Forest Research**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 1889–1903, 2012.
- CASALI, Sofia. Efeitos do regime de fogo e do contexto ambiental na diversidade dos campos do planalto serrano catarinense, sul do Brasil. [s. l.], 2023.
- CAUMO, Sofia *et al.* Human risk assessment of ash soil after 2020 wildfires in Pantanal biome (Brazil). **Air Quality, Atmosphere & Health**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2239–2254, 2022.
- CERTINI, Giacomo. Effects of fire on properties of forest soils: a review. **Oecologia**, [s. l.], v. 143, n. 1, p. 1–10, 2005.
- CHAI, Lihong *et al.* Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to Triclosan. **Chemosphere**, [s. l.], v. 182, p. 255–266, 2017.

CHRISTOPHER, Rowe *et al.* Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. **Freshwater Biology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 723–730, 1996.

COCHRANE, Mark A. Fire science for rainforests. **Nature**, [s. l.], v. 421, n. 6926, p. 913–919, 2003.

COELHO, Laura *et al.* Effects of Eucalypt ashes from moderate and high severity wildfires on the skin microbiome of the Iberian frog (*Rana iberica*). **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 313, p. 120065, 2022.

DEVI, L.M. *et al.* Morphological and microstructural changes of the oral apparatus in two Anuran tadpoles, in regard to pH. **Micron**, [s. l.], v. 82, p. 41–51, 2016.

DONG, Wen-jing *et al.* Rice straw ash and amphibian health: A deep dive into microbiota changes and potential ecological consequences. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 926, p. 171651, 2024.

FENOGLIO, Carla *et al.* Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 259–268, 2005.

FILHO, Oswaldo Pinto Ribeiro *et al.* Estudo da Desova de Rã-Touro, *Rana catesbeiana*, Mediante Indução do Acasalamento. [s. l.], 1998.

FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia: Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -melanocyte stimulating hormone. **Italian Journal of Zoology**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 298–305, 2016.

FRANKLIN, Natasha M. *et al.* pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 48, n. 2–3, p. 275–289, 2000.

GALEX, Ilana A *et al.* Evaluation of Effective and Practical Euthanasia Methods for Larval African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 269–274, 2020.

GONINO, Gabriel M.R. *et al.* Fire increases the productivity of sugarcane, but it also generates ashes that negatively affect native fish species in aquatic systems. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 664, p. 215–221, 2019a.

GONINO, Gabriel *et al.* Short-term effects of wildfire ash exposure on behaviour and hepatosomatic condition of a potamodromous cyprinid fish, the Iberian barbel *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864). **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 665, p. 226–234, 2019b.

GOSNER, Kenneth L. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. **Herpetologica**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 183–190, 1960.

GROTT, Suelen Cristina *et al.* Influence of temperature on biomarker responses and histology of the liver of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802) exposed to the herbicide Tebuthiuron. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 771, p. 144971, 2021.

HARPER, Ashleigh R. *et al.* Chemical composition of wildfire ash produced in contrasting ecosystems and its toxicity to *Daphnia magna*. **International Journal of Wildland Fire**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 726, 2019.

HARRIS, Rebecca M. B. *et al.* Climate–vegetation–fire interactions and feedbacks: trivial detail or major barrier to projecting the future of the Earth system?. **WIREs Climate Change**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 910–931, 2016.

HECNAR, Stephen J.; M'CLOSKEY, Robert T. Changes in the Composition of a Ranid Frog Community Following Bullfrog Extinction. **American Midland Naturalist**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 145, 1997.

IPCC. **Climate Change 2023: Synthesis Report**. [S. l.: s. n.], 2023.

JESUS, Fátima *et al.* Do Freshwater and Marine Bivalves Differ in Their Response to Wildfire Ash? Effects on the Antioxidant Defense System and Metal Body Burden. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1326, 2023.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA, 2013.

KAEFER, Ígor Luís; BOELTER, Ruben Alexandre; CECHIN, Sonia Zanini. Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. **Annales Zoologici Fennici**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 435–444, 2007.

KARAMI-MOHAJERI, Somayyeh; ABDOLLAHI, Mohammad. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1119–1140, 2011.

KARLFELDT FEDJE, Karin *et al.* Removal of hazardous metals from MSW fly ash—An evaluation of ash leaching methods. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 173, n. 1–3, p. 310–317, 2010.

KWAN, Garfield T. *et al.* Impacts of ash-induced environmental alkalization on fish physiology, and their implications to wildfire-scarred watersheds. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 953, p. 176040, 2024.

LI, Yiming *et al.* Frog community responses to recent American bullfrog invasions. **Current Zoology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 83–92, 2011.

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

MARCANTONIO, Adriana Sacioto *et al.* Histopathological changes in *Lithobates catesbeianus* tadpoles used as biomarkers of pesticide poisoning. **Boletim do Instituto de Pesca**, [s. l.], v. 48, 2023. Disponível em: <https://institutodepesca.org/index.php/bip/article/view/1740>. Acesso em: 26 jun. 2023.

MARENGO, Jose A. *et al.* Extreme Drought in the Brazilian Pantanal in 2019–2020: Characterization, Causes, and Impacts. **Frontiers in Water**, [s. l.], v. 3, p. 639204, 2021.

MARTINELLI, Luiz A.; FILOSO, Solange. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and social challenges. **Ecological Applications**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 885–898, 2008.

MCDIARMID, Roy W.; RONALD ALTIG. **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999.

MCDONALD, Logan A. *et al.* Stage-specific effects of fire: Effects of prescribed burning on adult abundance, oviposition habitat selection, and larval performance of Cope's Gray Treefrog (*Hyla chrysoscelis*). **Forest Ecology and Management**, [s. l.], v. 430, p. 394–402, 2018.

NUNES, Bruno *et al.* Off-site impacts of wildfires on aquatic systems — Biomarker responses of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 581–582, p. 305–313, 2017.

OLIVEIRA-FILHO, Eduardo C. *et al.* Effects of ashes from a Brazilian savanna wildfire on water, soil and biota: An ecotoxicological approach. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 618, p. 101–111, 2018.

OO, Hay Mon *et al.* Physicochemical characterization of forest and sugarcane leaf combustion's particulate matters using electron microscopy, EDS, XRD and TGA. **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 99, p. 296–310, 2021.

PAUL, Sagorika *et al.* A comparative account of phototoxicity of anthracene and pyrene in the tadpoles of the anuran amphibian *Fejervarya limnocharis* using multiple toxicological end points. **Ecotoxicology**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10646-024-02774-8>. Acesso em: 9 ago. 2024.

PINTO-VIDAL, Felipe Augusto *et al.* Metabolic, immunologic, and histopathologic responses on premetamorphic American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) following exposure to lithium and selenium. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 270, p. 116086, 2021.

QUIROGA, Lorena *et al.* Diet of Bullfrog Tadpoles *Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802, an Invasive Species from Monte Desert. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 56, n. 3, 2022. Disponível em: <https://bioone.org/journals/journal-of-herpetology/volume-56/issue-3/21-057/Diet-of-Bullfrog-Tadpoles-Lithobates-catesbeianus-Shaw-1802-an-Invasive/10.1670/21-057.full>. Acesso em: 24 jul. 2024.

R Core Team (2023). **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

RAIMONDO, Sandra M.; ROWE, Christopher L.; CONGDON, Justin D. Exposure to Coal Ash Impacts Swimming Performance and Predator Avoidance in Larval Bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 289, 1998.

RÉ, Ana *et al.* Impacts of wildfires in aquatic organisms: biomarker responses and erythrocyte nuclear abnormalities in *Gambusia holbrooki* exposed in situ. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 28, n. 37, p. 51733–51744, 2021.

REGNAULT, Christophe *et al.* Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 155, p. 519–527, 2016.

RIVERO-WENDT, Carla Leticia Gediel *et al.* Cytogenotoxic potential and toxicity in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to chloramine T. **PeerJ**, [s. l.], v. 11, p. e16452, 2023.

RUI, Liangyou. Energy Metabolism in the Liver. In: TERJUNG, Ronald (org.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2014. p. 177–197. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c130024>. Acesso em: 13 Nov. 2024.

RUTKOSKI, Camila Fatima *et al.* Hepatic and blood alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to sulfamethoxazole and oxytetracycline. **Chemosphere**, [s. l.], v. 307, p. 136215, 2022.

SÁNCHEZ-GARCÍA, C. *et al.* Chemical characteristics of wildfire ash across the globe and their environmental and socio-economic implications. **Environment International**, [s. l.], v. 178, p. 108065, 2023.

SANSEVERO, Jerônimo B.B *et al.* Fire drives abandoned pastures to a savanna-like state in the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 31–36, 2020.

SANTÍN, Cristina *et al.* Quantity, composition and water contamination potential of ash produced under different wildfire severities. **Environmental Research**, [s. l.], v. 142, p. 297–308, 2015.

SANTOS, Diogo *et al.* Effects of aqueous extracts of wildfire ashes on tadpoles of *Pelophylax perezii*: Influence of plant coverage. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 854, p. 158746, 2023a.

SANTOS, D. *et al.* Impacts of aqueous extracts of wildfire ashes on aquatic life-stages of *Xenopus laevis*: Influence of plant coverage. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 262, p. 106664, 2023b.

SCHLOEGEL, L. M. *et al.* The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil: The North American bullfrog as a reservoir for the spread of an amphibian pathogen. **Animal Conservation**, [s. l.], v. 13, p. 53–61, 2010.

SILVA, Emanuel Teixeira Da *et al.* Diet of the Invasive Frog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae) in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. **South American Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 286–294, 2009.

SILVA, Vera *et al.* Toxicity assessment of aqueous extracts of ash from forest fires. **CATENA**, [s. l.], v. 135, p. 401–408, 2015.

STEINEL, Natalie C.; BOLNICK, Daniel I. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, p. 827, 2017.

SÜHS, Rafael Barbizan *et al.* The influence of fire and cattle grazing on Araucaria population structure in forest-grasslands mosaics. **Flora**, [s. l.], v. 281, p. 151853, 2021.

THABAH, C. M. *et al.* Microscopic Studies on the Effects of pH on the Oral Morphology of *Hyla annectans* Tadpoles from North East India. **Journal of Advanced Microscopy Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 285–290, 2014.

WESTERLING, A. L. *et al.* Climate change and growth scenarios for California wildfire. **Climatic Change**, [s. l.], v. 109, n. S1, p. 445–463, 2011.

APÊNDICE A

Tabela 2 - Valores dos parâmetros físicos e químicos da água em exposição aguda (96 horas) às cinzas de incêndios florestais.

Antes da contaminação				Após a contaminação		
Concentração (g/L)	pH	O. D. (mg/L)	T (°C)	pH	O. D. (mg/L)	T (°C)
0	6,60 ± 0,14	10,20 ± 0,49	26,70 ± 0,00	7,85 ± 0,07	10,10 ± 0,07	27,00 ± 0,07
2	6,85 ± 0,35	10,00 ± 0,14	26,80 ± 0,07	9,85 ± 0,07	08,59 ± 0,62	27,20 ± 0,00
4	6,60 ± 0,00	10,30 ± 0,13	26,80 ± 0,21	10,10 ± 0,14	09,12 ± 0,12	27,00 ± 0,21
8	7,00 ± 0,56	10,90 ± 0,71	26,80 ± 0,21	10,40 ± 0,00	09,63 ± 1,64	27,20 ± 0,00
16	6,80 ± 0,28	09,81 ± 0,05	26,80 ± 0,21	10,60 ± 0,00	08,61 ± 0,26	27,10 ± 0,00
32	6,85 ± 0,07	10,00 ± 0,01	26,80 ± 0,71	10,60 ± 0,07	08,37 ± 0,14	27,20 ± 0,07

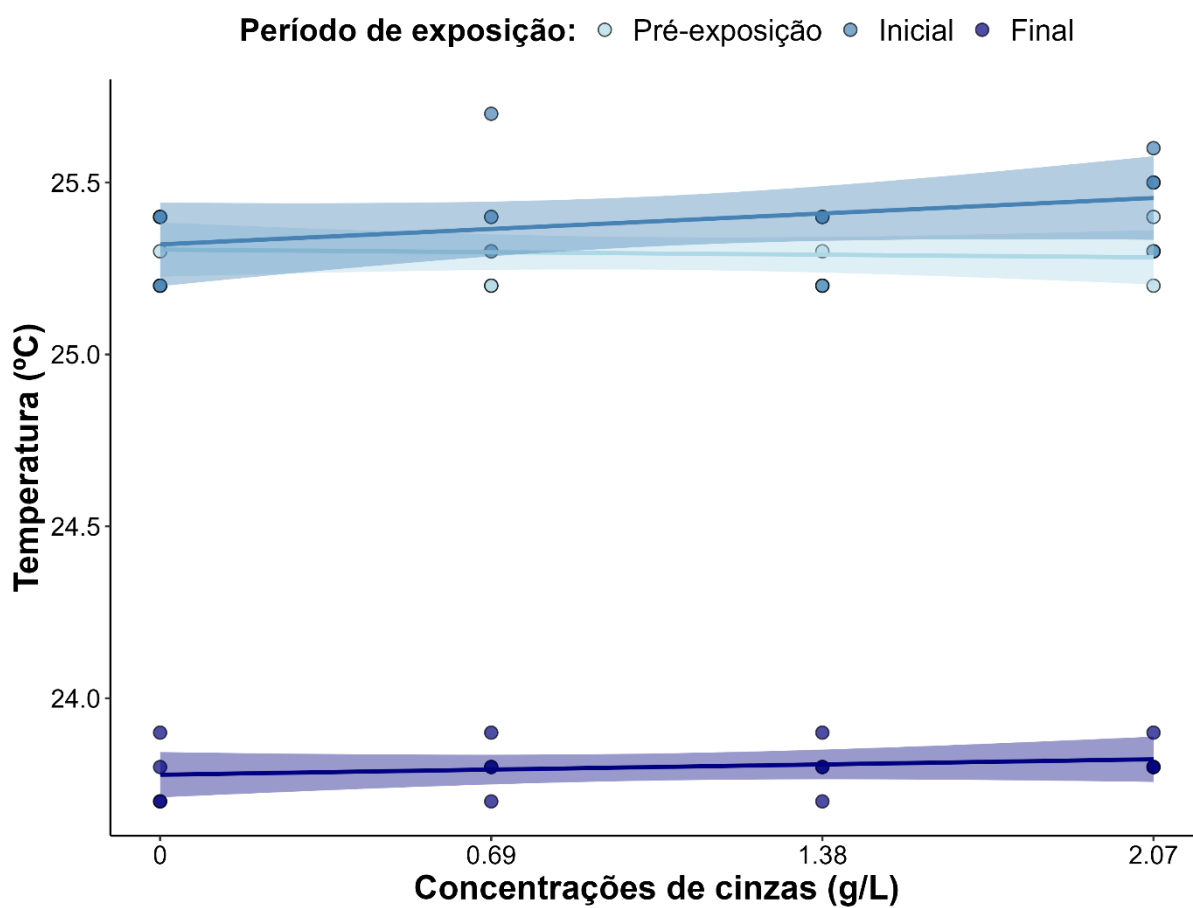
Valores em destaque representam diferença estatística ($P < 0,05$) em relação aos grupos controle (0 g/L);

Legenda: Oxigênio dissolvido (O.D.); Temperatura (T)

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B

Figura 8 - Temperatura (°C) das unidades experimentais contaminadas por concentrações subletais de cinzas (0, 0,69, 1,38 e 2,07 g/L) em diferentes períodos de exposição.



Fonte: elaborado pelo autor.