

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
E MONITORAMENTO AMBIENTAL

Gabriel Hiroshi Fujiwara

**ECOTOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS DE POLIETILENO E
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ISOLADOS E CONJUGADOS NAS
BRÂNQUIAS E FÍGADOS DE GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802)**

Sorocaba

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
E MONITORAMENTO AMBIENTAL

Gabriel Hiroshi Fujiwara

**ECOTOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS DE POLIETILENO E
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ISOLADOS E CONJUGADOS NAS
BRÂNQUIAS E FÍGADOS DE GIRINOS DE *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Orientação: Prof^a Dr^a Cleoni dos Santos Carvalho

Financiamento: CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Sorocaba



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gabriel Hiroshi Fujiwara, realizada em 29/08/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho (UFSCar)

Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman (UFSCar)

Prof. Dr. Pierre Ferreira do Prado (Thau lab)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, presto, com carinho, meus mais sinceros sentimentos de gratidão aos meus pais pela educação recebida, pelos conselhos vindos das experiências e conquistas da Vida, pelas lutas e pelos sacrifícios feitos por mim e por meus irmãos, pela fé inabalável e pelo amor incondicional, que me fizeram chegar tão longe e que continuam a impulsionar o meu crescimento humano. Agradeço, também, ao amor fraterno de minha segunda mãe, Jani, que me viu crescer, que cuidou de mim nos tempos de meninice e, até hoje, segue zelando-me, sempre a motivar o que há de melhor em mim.

Professora Cleoni, minha estimada orientadora, que vem me guiando desde 2019, quando realizei minha primeira Iniciação Científica, a ti, agradeço pela paciência, pelo respeito e pela temperança com que sempre me tratou. Sou igualmente grato por todas as portas de oportunidades que você, generosamente, abriu e me ofereceu, permitindo que eu crescesse e me desenvolvesse no mundo acadêmico, profissional e na pesquisa. Muito obrigado, professora, por enxergar e acreditar nas minhas potencialidades, por enriquecer meu conhecimento científico e por revelar e cultivar em mim um espírito curioso e investigativo — tão próprio dos cientistas —, e que, até então, eu desconhecia. Além disso, sou profundamente grato por todos os esforços que sempre empreendeu para que eu pudesse concluir cada etapa acadêmica da melhor forma possível, e por sua constante preocupação com meu bem-estar.

Heidi, minha querida amiga e preceptora, agradeço imensamente por compartilhar e ensinar, desde 2016, de maneira diligente e altruísta, as técnicas e os procedimentos laboratoriais que me acompanharam ao longo dos anos de pesquisa. Muito obrigado pela confiança que constantemente depositou em mim; por me ajudar, sem hesitar, sempre quando precisei; por me inspirar resiliência nos tempos difíceis; por dispor, em todas as circunstâncias, um ombro amigo; por me encorajar a continuar aprendendo cada vez mais; e por estar presente tanto nos meus momentos de euforia quanto de silêncio.

Agradeço a cada amigo e colega da pós-graduação que me acompanhou nessa jornada, tornando minha caminhada mais leve, e que me presenteou com uma amizade sincera e recíproca. Resigno-me a não os mencionar formalmente, para não faltar com a memória de alguém; mas saibam que, em meu coração, às vossas amizades reservo o infinito. Com vocês aprendi que, de fato, a verdadeira felicidade é aquela em que se pode compartilhar.

Agradeço ao PPGBMA, ao corpo docente e a toda equipe da coordenação pelo acolhimento e pelas oportunidades oferecidas durante toda a trajetória no mestrado. Agradeço, em especial, à coordenadora Prof.^a Iolanda, pelo cuidado com os discentes, por estar sempre de portas abertas para

nos atender e ouvir, e pela sua luta diária à manutenção e à excelência do programa.

Agradeço à minha banca de qualificação – professoras Mônica Jones e Juliane Freitas – e à banca de defesa – professores Walter Waldman e Pierre Prado –, pelo tempo doado, por enriquecerem minha tese, compartilhando conhecimentos valiosos, e por toda cordialidade e gentileza com que me trataram durante todo o momento.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo amparo financeiro concedido por meio da bolsa de fomento à pós-graduação que possibilitou minha permanência no programa, assim como à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da minha pesquisa (FAPESP, 2017/23781-9 e 2019/08491-0).

Por fim, agradeço a todos os demais amigos, colegas, conhecidos, familiares e professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para eu conseguisse chegar até aqui.

“If I have seen further, it is by standing on the shoulders of Giants.”

Isaac Newton

RESUMO

Fujiwara, Gabriel Hiroshi. Ecotoxicidade de Microplásticos de Polietileno e Nanopartículas de Dióxido de Titânio isolados e conjugados nas brânquias e fígados de girinos de *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802). 2025. Dissertação de Mestrado em Nome do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2025.

Atualmente, de acordo com a Segunda Avaliação Global dos Anfíbios, a degradação do habitat é reconhecida como uma das principais causas do declínio populacional dos anfíbios, sendo a poluição um dos principais fatores contribuintes para essa perda. Entre os poluentes emergentes que têm ganhado destaque — tanto por sua relevância econômica quanto por seus potenciais impactos ambientais — estão os microplásticos e os nanomateriais. Embora os efeitos individuais desses poluentes sobre os anfíbios já tenham sido estudados, ainda existem lacunas significativas no conhecimento sobre as respostas combinadas desencadeadas por diferentes classes de microplásticos e nanopartículas. Diante da urgência em compreender essa dinâmica ecotoxicológica, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as respostas de biomarcadores de estresse oxidativo, atividades enzimáticas antioxidantes e de desintoxicação nos fígados e brânquias de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) expostos a microplásticos de polietileno (PE-MPs) (60 mg/L) e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NPs) (10 µg/L), isolados e combinados, após 15 dias de exposição. As análises laboratoriais demonstraram que a coexposição aos microplásticos e às nanopartículas induziu maior resposta em ambos os órgãos. Nas brânquias, a mistura desses compostos resultou em um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), enquanto os grupos tratados individualmente com PE-MPs ou TiO₂-NPs não apresentaram alterações significativas nos níveis enzimáticos ou nos indicadores de estresse oxidativo. No fígado, a coexposição induziu aumento da atividade da glutathione S-transferase (GST) e dos níveis de lipoperoxidação. Já no grupo exposto apenas aos PE-MPs, observou-se aumento da atividade da SOD e dos níveis de lipoperoxidação. Por outro lado, nenhum dos órgãos expostos exclusivamente às TiO₂-NPs apresentou alterações significativas nos parâmetros analisados. Esses resultados revelam a complexidade das interações entre esses dois contaminantes, e ressaltam a importância de estudar os efeitos toxicológicos de poluentes em diferentes órgãos, considerando que cada tecido pode responder de maneira distinta a diferentes substâncias, e que a distribuição desses compostos no organismo não é uniforme. Além disso, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nessas respostas bioquímicas, assim como investigações adicionais sobre os possíveis impactos desses contaminantes em outras espécies de anfíbios e nos ecossistemas em que vivem.

Palavras-chave: Anfíbios; Microplásticos; Biomarcadores; Nanopartículas; contaminantes emergentes.

ABSTRACT

Currently, according to the Second Global Amphibian Assessment, habitat degradation is recognized as one of the main causes of amphibian population decline, with pollution being a major contributing factor to this loss. Among the emerging pollutants that have gained attention—both for their economic relevance and their potential environmental impacts—are microplastics and nanomaterials. Although the individual effects of these pollutants on amphibians have already been studied, significant gaps remain regarding the combined responses triggered by different classes of microplastics and nanoparticles. Given the urgency of understanding this ecotoxicological dynamic, the present study aimed to evaluate the responses of oxidative stress biomarkers, antioxidant enzymatic activity, and detoxification processes in the livers and gills of bullfrog (*Aquarana catesbeiana*) tadpoles exposed to polyethylene microplastics (PE-MPs) (60 mg/L) and titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs) (10 µg/L), both individually and in combination, after 15 days of exposure. Laboratory analyses demonstrated that co-exposure to microplastics and nanoparticles induced greater responses in both organs. In the gills, the mixture of these compounds resulted in increased activity of superoxide dismutase (SOD), while the groups treated individually with PE-MPs or TiO₂-NPs showed no significant changes in enzymatic levels or oxidative stress indicators. In the liver, co-exposure led to increased activity of glutathione S-transferase (GST) and elevated levels of lipid peroxidation. In the group exposed only to PE-MPs, an increase in SOD activity and lipid peroxidation levels were observed. On the other hand, neither organ exposed exclusively to TiO₂-NPs exhibited significant alterations in the analyzed parameters. These results reveal the complexity of interactions between these two contaminants and highlight the importance of studying the toxicological effects of pollutants across different organs, considering that each tissue may respond differently to various substances and that the distribution of these compounds within the organism is not uniform. Furthermore, additional studies are needed to understand the mechanisms underlying these biochemical responses, as well as further investigations into how these substances may impact other amphibian species and the ecosystems they inhabit.

Keywords: Amphibians; Microplastics; Biomarkers; Nanoparticles; Emerging contaminants.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figura 1 – Respostas dos biomarcadores bioquímicos nas brânquias.....	37
Figura 2 – Respostas dos biomarcadores bioquímicos no fígado.....	42
Figura 3 – Índices das Respostas Integradas dos Biomarcadores.....	44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Valores dos Índices das Respostas Integradas dos Biomarcadores.....	43
--	----

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	1
1.1. Panorama Global dos Anfíbios	1
1.1. Aquarana catesbeiana	4
1.2. Microplásticos de Polietileno e sua relação com os anfíbios	6
1.3. Nano partículas de Dióxido de Titânio (TiO₂) e sua relação com os anfíbios	9
2. Justificativa, Relevância do tema	11
3. Objetivos	12
4. Materiais e Métodos, Resultados e Discussão	13
REFERÊNCIAS	14
5. Artigo	28
5.1. Introdução	28
5.2. Materiais e Método	30
5.2.1. <i>Modelo Animal</i>	31
5.2.2. <i>Delineamento dos ensaios ecotoxicológicos</i>	31
5.2.3. <i>Ensaio de Exposição</i>	32
5.2.4. <i>Análises Bioquímicas</i>	33
5.2.5. <i>Análise Estatística</i>	34
5.3. Resultados e Discussão	34
5.3.1. <i>Respostas dos biomarcadores nas brânquias dos girinos</i>	34
5.3.2. <i>Respostas dos biomarcadores no fígado dos girinos</i>	39
5.3.3. <i>Respostas das Respostas Integradas dos Biomarcadores</i>	43
5.4. Conclusão	46
REFERÊNCIAS	47

1. Introdução Geral

1.1. Panorama Global dos Anfíbios

Os anfíbios modernos estão classificados na subclasse Lissamphibia, que compreende três clados principais: Salientia, Caudata e Gymnophionomorpha. Esses clados são representados, respectivamente, pelos grupos coroas Anura (sapos, rãs e pererecas), Urodela (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cecílias), os quais englobam todas as espécies viventes e os seus ancestrais comuns mais próximos (CANNATELLA; HILLIS, 2004; RUTA; COATES, 2007; MARJANOVIĆ; LAURIN, 2008; SIGURDSEN; GREEN, 2011; SCHOCH, 2014; KLIGMAN et al., 2023; HOLMES et al., 2024). Essa subclasse também inclui a família extinta Albanerpetontidae, que existiu do Batoniano (Jurássico Médio) até o início do Pleistoceno, e apresentam características morfológicas distintas, como os ossos frontais fundidos; articulações interdigitais na mandíbula; dentes marginais longos e em forma de cinzel; e vértebras cervicais (atlas e axis) modificadas, formando uma faceta tripartida (FOX; NAYLOR, 1982; SCHOCH, 2014; GUILLAUME et al., 2023).

Segundo estimativas baseadas em análises de relógios moleculares e evidências fósseis, o grupo Anura teria surgido no final do período Triássico, há mais de 200 milhões de anos (ROELANTS; BOSSUYT, 2005; STOCKER et al., 2019). Fósseis provenientes da Formação Chinle, no Arizona — datada do final do Triássico — sugerem que representantes do grupo coroa dos anuros já estavam presentes nesse período (STOCKER et al., 2019). Essas descobertas corroboram as estimativas propostas por Roelants e Bossuyt (2005), cujas análises moleculares, associadas ao registro fóssil, indicaram que quatro linhagens de anuros se originaram antes da fragmentação da Pangeia. Esse cenário paleobiogeográfico pode ter influenciado diretamente a diversificação inicial e a dispersão espacial desses organismos ao longo do tempo. Mesmo apresentando uma ampla distribuição global, a maior concentração da biodiversidade de anuros existente hoje, por volta de 7047 espécies, encontra-se nas regiões neotropicais (RE:WILD et al., 2023).

Os primeiros registros fósseis do grupo Urodela datam do período Jurássico, com exemplares bem preservados provenientes de formações geológicas da China. Entre eles, destaca-se *Chunerpeton tianyiensis*, encontrado na Formação Jiulongshan, com idade estimada em aproximadamente 160 milhões de anos (GAO; SHUBIN, 2003; WANG; DONG; EVANS, 2016). Outras espécies representativas desse período incluem *Linglongtriton daxishanensis* e *Beiyanerpeton jianpingensis*, ambas provenientes da Formação Tiaojishan, também datada do Jurássico (~160 milhões de anos) (GAO; SHUBIN, 2012; JIA; GAO, 2019). Assim como

observado nos anuros, os registros fósseis de diversas famílias de urodelos — como Sirenidae, Hynobiidae, Proteidae, Plethodontidae, Dicamptodontidae e Salamandridae — majoritariamente localizados no hemisfério norte, coincidem com os padrões atuais de distribuição desses organismos (SCHOCH, 2014). Atualmente, a maior diversidade de urodelos, que compreende aproximadamente 758 espécies, concentra-se dispersa na América do Norte, China, Europa, Mesoamérica e Japão (RE:WILD et al., 2023).

Embora se estime que a origem do grupo Gymnophiona tenha se diversificado por volta do Jurássico Inferior (WILKINSON et al., 2011; KAMEI et al., 2012; KLIGMAN et al., 2023), os fósseis de representantes desse grupo são escassos. Fragmentos atribuídos a essa ordem são mais bem documentados entre o final do Cretáceo (~80 milhões de anos) e o Mioceno (~20 milhões de anos), com registros concentrados em regiões que hoje correspondem à América do Sul e ao leste da África (ESTES; WAKE, 1972; RAGE et al., 1991; EVANS; MILNER; WERNER, 1996; GAYET et al., 2001; RAGE; PICKFORD, 2011; SANTOS et al., 2024). No presente, a maior parte da diversidade de Gymnophiona, cerca de 206 espécies, encontra-se concentrada nas regiões tropicais da Mesoamérica, América do Sul, África e Ásia (RE:WILD et al., 2023).

Os lissanfíbios compartilham diversas sinapomorfias morfológicas, como dentes pedicelados e bicúspides, a presença da papilla amphibiorum no ouvido interno e um cotovelo articulado (característica perdida em Gymnophiona), todavia, os grupos mais derivados são comumente caracterizados por apresentarem ectotermia, pele permeável rica em glândulas, esqueleto pouco ossificado e um ciclo de vida bifásico (aquático-terrestre), com ovos desprovidos de casca (SCHOCH, 2014). No entanto, essa última característica não é universal entre os anfíbios modernos, onde há espécies de anuros e urodelos que apresentam ciclos de vida unifásicos, com desenvolvimento direto, além de casos de neotenia em salamandras, em que as características juvenis são mantidas na fase adulta; nas cecílias, a maioria das espécies é vivípara, com exceção das famílias Ichthyophiidae e Rhinatrematidae, que depositam ovos próximos a corpos d'água (SAN MAURO et al., 2014; SCHOCH, 2014).

Essas características biológicas particulares dos anfíbios modernos — como a permeabilidade da pele, o ciclo de vida bifásico e a ausência de casca nos ovos —, associadas à sua ampla distribuição geográfica, fazem esses organismos serem especialmente vulneráveis à descarga de poluentes e às alterações de habitat; ao mesmo tempo, essas mesmas características os tornam bons bioindicadores da qualidade ambiental, uma vez que sinais como flutuações populacionais anormais, aumento na incidência de doenças ou elevação nas cargas

parasitárias podem refletir processos mais abrangentes da degradação do ambiente (Venturino et al., 2003; Koprivnikar et al., 2012; Brodeur; Candiotti, 2017; Amado; Palma, 2024; Frątczak et al., 2025).

Embora a percepção de quedas populacionais localizadas de anfíbios remonte ao início e meados do século XX (GRINNELL; STORER, 1924; BRAGG, 1952), a preocupação científica com o declínio global desses vertebrados emergiu apenas no final da década de 1980. A Primeira Conferência Mundial de Herpetologia, realizada em 1989, em Canterbury, Inglaterra, difundiu amplamente os alertas da comunidade científica sobre essa crise populacional (WYMAN, 1990; GREEN et al., 2020). Nesse contexto, um workshop promovido pelo National Research Council (NRC), em fevereiro de 1990, na cidade de Irvine, Estados Unidos, fomentou a criação de uma força-tarefa para o estudo e a conservação de espécies de anfíbios potencialmente ou efetivamente ameaçadas, conhecida como Declining Amphibian Populations Task Force (DAPTF), em colaboração com a Comissão de Sobrevivência de Espécies da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (GARDNER, 2001).

Em 2005, a DAPTF uniu-se ao Global Amphibian Specialist Group (GASG), resultando na formação do atual Amphibian Specialist Group (ASG), vinculado à Comissão de Sobrevivência de Espécies da IUCN (IUCN SSC). Esse grupo passou a contar com um secretariado denominado Amphibian Red List Authority (ARLA), responsável por coordenar a compilação e atualização dos dados relacionados a anfíbios na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, além de promover as edições das Avaliações Globais dos Anfíbios (GAA) (IUCN, 2025).

De acordo com a Segunda Avaliação Global dos Anfíbios (GAA2), publicada em 2023, cerca de 41% das espécies conhecidas de anfíbios estão ameaçadas de extinção, totalizando aproximadamente 2.873 espécies — o que torna essa classe de vertebrados a mais ecologicamente vulnerável (RE:WILD et al., 2023). Ainda, de acordo com a atualização mais recente da Lista Vermelha da IUCN, em 27 de março de 2025, das espécies ameaçadas, 798 encontram-se na categoria de “ criticamente em Perigo ” (IUCN, 2025).

Os fatores de ameaça que atuam sobre cada população são complexos e variados, refletindo a diversidade de nichos, habitats e particularidades biológicas desses organismos (LUEDTKE et al., 2023). No entanto, ao se considerar a totalidade da biodiversidade de anfíbios, é possível identificar um padrão de causas principais associadas ao declínio populacional: degradação de habitat (93%), mudanças climáticas (29%), doenças — especialmente quitridiomicose (22%) —, incêndios (21%), introdução de espécies invasoras

(14%) e a exploração infrene de espécies para fins nutricionais, medicinais e como animais de estimação exóticos (9%) (LUEDTKE et al., 2023; RE:WILD et al., 2023). Tanto a GAA2 quanto Luedtke et al. (2023) apontam que todas essas ameaças estão diretas ou indiretamente relacionadas às atividades humanas. Dessa forma, estratégias de conservação da biodiversidade dos anfíbios, bem como a garantia da integridade ambiental, devem integrar a compreensão dos impactos antropogênicos sobre os animais e o ambiente.

1.2. Aquarana catesbeiana

A espécie *Aquarana catesbeiana*, popularmente conhecida como rã-touro, ocorre naturalmente no leste e centro-oeste dos Estados Unidos, além do sudeste do Canadá (BURY; WHELAN, 1984; DODD, 2023). Uma das primeiras descrições dessa espécie foi publicada em 1694, na revista científica *Philosophical Transactions* da Royal Society, na qual o autor a descreve brevemente como “prodigiosamente grande”, destacando sua vocalização semelhante ao mugido de um touro e ao canto oco de um abetouro (CLAYTON, 1694). Posteriormente, em 1754, o naturalista inglês Mark Catesby atribuiu à espécie o nome científico *Rana maxima Americana Aquatica*. Esse nome foi posteriormente substituído por *Rana catesbeiana*, em homenagem a Catesby, pelo também naturalista inglês George Shaw, em 1802, no terceiro volume de sua obra *General Zoology, or Systematic Natural History* (CATESBY, 1754; SHAW, 1802). Atualmente, a espécie é classificada na família Ranidae, gênero *Rana*, subgênero *Aquarana* (MACGUIGAN et al., 2022). No entanto, as análises filogenéticas de Dubois, Ohler e Pyron (2021) reconhecem *Aquarana* como um gênero autônomo, irmão de *Boreorana* e *Lithobates*. Essas divergências taxonômicas refletem o uso de diferentes formas de se referir à espécie, como *Aquarana catesbeiana*, *Rana catesbeiana* ou *Rana (Aquarana) catesbeiana* (LI et al., 2024; O'SHEA; MADDOCK, 2024; XU et al., 2024). Neste trabalho, para fins de padronização, será adotada a nomenclatura *Aquarana catesbeiana*.

A espécie destaca-se entre os maiores anuros existentes, sendo a maior espécie nativa da América do Norte (BURY; WHELAN, 1984). Os exemplares adultos selvagens apresentam comprimento corporal que varia entre 85 e 200 mm, com os maiores indivíduos podendo atingir entre 200 e 300 gramas, e com sua pele variando de um verde-oliva claro até um marrom, além de não apresentarem pregas dorsolaterais (BURY; WHELAN, 1984; DODD, 2023).

Seu ciclo de vida inclui uma metamorfose completa. Durante a fase larval, os girinos podem alcançar até 170 mm (corpo + cauda), embora a metamorfose ocorra normalmente quando alcançam aproximadamente 100 mm, possuem respiração por brânquias e alimentam-

se, em grande parte, de material vegetal e plânctons (DODD, 2023). A transformação para a fase adulta pode levar de um a quatro anos, dependendo das condições ambientais (DUELLMAN; TRUEB, 1994; DODD, 2023). Na fase adulta, a espécie passa a respirar pelos pulmões e pela pele, e adota uma dieta predominantemente carnívora (DODD, 2023).

Os machos, geralmente menores que as fêmeas, apresentam antebraços mais robustos e polegares aumentados durante o período reprodutivo, o que facilita a aderência durante o amplexo (DODD, 2023). Outra característica sexual distintiva é o tamanho do tímpano, nos machos, ele é visivelmente maior que o olho, enquanto nas fêmeas, ambos possuem proporções semelhantes (DODD, 2023). A vocalização, exclusiva dos machos, tem como função atrair parceiras e estabelecer territórios, onde o som é produzido pela movimentação de ar entre os pulmões e as bolsas vocais (BURY; WHELAN, 1984; DODD, 2023).

Durante a reprodução, as fêmeas depositam massas de ovos que flutuam na superfície da água. Essas massas têm formatos discoides, podendo medir de 20 centímetros a mais de um metro de diâmetro e conter uma média de 10.000 e 20.000 ovos (BURY; WHELAN, 1984; DODD, 2023). Após alguns minutos, essa camada gelatinosa pode afundar, ou se agrupar a vegetação circundante. Cada ovo possui um vitelo com diâmetro entre 1,2 e 1,7 mm, envolto por uma cápsula gelatinosa e uma membrana externa que mede de 6,0 a 10,4 mm; a incubação é breve, com eclosão ocorrendo entre três e cinco dias após a desova (DODD, 2023).

Devido à sua capacidade de ocupar e adaptar-se a diferentes tipos de zonas úmidas, além do porte avantajado, a rã-touro passou a ser explorada como uma fonte alternativa de proteína para o consumo humano. Essa demanda levou à sua introdução gradual em várias regiões dos Estados Unidos, em países da América do Sul, Europa, Ásia e nas ilhas do Caribe (D'AMORE, 2012). Com o tempo, por meio de fugas acidentais e liberações inadequadas a partir de ranários, a espécie acabou se estabelecendo como invasora, apresentando elevado potencial de impacto ambiental (KRAUS, 2009; D'AMORE, 2012, RE:WILD et al., 2023). Entre os principais danos estão a predação e a competição com espécies nativas, além de seu papel como reservatório de doenças, como fungos patogênicos (e.g., *Batrachochytrium dendrobatidis*) responsáveis por quitridiomicoses (D'AMORE, 2012, RE:WILD et al., 2023).

Embora hoje a espécie *A. catesbeiana* seja mais conhecida como uma espécie invasora, ela também desempenha um importante papel como um organismo modelo em estudos ecotoxicológicos, devido às suas respostas a contaminantes ambientais e à sua alta distribuição global (BOONE et al., 2007; WAGNER; BRÜHL, 2017; CARVALHO; VIDAL, 2024; FREITAS, 2024). Pesquisas recentes evidenciam seu potencial na avaliação da qualidade da

água, dos efeitos de poluentes e das interações com parasitas e patógenos (ASH et al., 2024; CAMPIÃO et al., 2024; CHEN et al., 2024; ARJONAS et al., 2025).

Girinos de rã-touro têm mostrado sensibilidade a uma variedade de contaminantes de relevância ambiental, incluindo metais, fármacos, defensivos agrícolas, microplásticos e nanopartículas, resultando em alterações histomorfológicas e respostas fisiológicas, bioquímicas e genéticas (COSTA et al., 2008; SALLA et al., 2016; VELDHOEN et al., 2014; AMARAL et al., 2019a; CARVALHO et al., 2020; CHAGAS et al., 2020; FERNANDES et al., 2024; WANG et al., 2025; MORAES et al., 2025). Além disso, ensaios agudos (96 horas) com amostras ambientais, águas fluviais e material particulado sedimentável atmosférico, foram capazes de desencadear efeitos toxicológicos detectáveis em girinos, como disfunções no sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx), aumento do estresse oxidativo (lipoperoxidação e carbonilação proteica), bioacumulação de metais (estrôncio, cromo, lantânio) e danos genotóxicos ao DNA de eritrócitos (FERNANDES et al., 2021; COSTA et al., 2024; FERNANDES et al., 2024; CARVALHO et al., 2025). Essas evidências reforçam o uso desse animal como um organismo modelo adequado para ensaios ecotoxicológicos voltados nas avaliações de biomarcadores de efeito e exposição.

1.3. Microplásticos de Polietileno e sua relação com os anfíbios

Em 1898, o químico alemão Hans von Pechmann relatou, na revista *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, a formação de uma substância branca e escamosa enquanto estudava reações de decomposição do diazometano; essa substância, cristalizada a partir do clorofórmio, separava-se de uma solução etérea de diazometano (PECHMANN, 1898). Em 1900, Eugen Bamberger e Friedrich Tschirner caracterizaram essa substância como uma cadeia formada por grupos metileno, denominando-a “flocos de polimetileno” (*Polymethylenflocken*, em alemão), hoje compreendida como sendo o polietileno, cuja produção ocorre por meio da polimerização do etileno (BAMBERGER; TSCHIRNER, 1900; PEACOCK, 2000).

Embora a descoberta acidental desse polímero remonte a esses dois episódios históricos, sua exploração e utilização comercial só começou na década de 1930. Isso ocorreu com a redescoberta e síntese do material pelos cientistas britânicos Eric Fawcett e Reginald Gibson, durante investigações sobre reações entre etileno e benzaldeído sob alta pressão (PEACOCK, 2000; DEMIRORS, 2011). Posteriormente, Michael Perrin aperfeiçoou a técnica para produção industrial, e o material passou a ser comercializado pela Imperial Chemical Industries (ICI), a

partir de 1937, sendo utilizado quase exclusivamente em cabos e componentes de isolamento elétrico durante a Segunda Guerra Mundial (PEACOCK, 2000).

Hoje o polietileno destaca-se por ser uma matéria-prima versátil e amplamente presente no cotidiano. Utilizado em uma ampla variedade de produtos — desde embalagens plásticas até componentes automobilísticos e eletrônicos modernos — esse polímero é comumente classificado de acordo com sua densidade em três principais tipos: polietileno de alta densidade (PEAD, 0,940 – 0,970 g/cm³), polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno linear de baixa densidade (PEBDL), ambos variando entre 0,915 e 0,935 g/cm³ (MCKEEN, 2013; YAO; SEONG; JANG, 2022). Esse plástico é um dos polímeros mais sintetizado no mundo. Somente em 2020, foram produzidas aproximadamente 104,1 milhões de toneladas (Mt) globalmente, tornando-o o plástico mais utilizado nesse ano. Estima-se que, até 2040, essa produção cresça para 173,4 Mt/ano (OECD, 2024).

Paralelamente, segundo a OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (2024), no seu relatório *“Policy Scenarios for Eliminating Plastic Pollution by 2040”*, apenas 14% de todo o plástico descartado é reciclado, o restante é incinerado (17%), destinado a aterros sanitários (50%) ou mal gerenciado (19%). Entre os resíduos plásticos despejados no ambiente, cerca de 31% se acumulam em sistemas aquáticos (rios e oceanos), enquanto os outros 69% permanecem no sistema terrestre.

Nesse cenário, a alta demanda comercial, associada à carência de políticas práticas eficazes para a redução e gestão de resíduos plásticos, torna o polietileno um potencial risco ambiental de relevância global, capaz de comprometer o equilíbrio dos diferentes ecossistemas do planeta.

Esses riscos decorrem das propriedades físico-químicas desse material, cuja estrutura química estável, hidrofóbica e de elevado peso molecular (variando de 40 até 6.000 kDa) dificultam sua completa degradação por processos naturais, tornando-o um contaminante persistente (ORAL; MURATOGLU, 2016; KUBOWICZ; BOOTH, 2017; MONTAZER; NAJAFI; LEVIN, 2020; EL-SHERIF; ELOFFY; ELMESERY, 2022; ZHUANG; SEONG; JANG, 2022). Também, ele pode tanto interagir com outros xenobióticos, modificando a toxicodinâmica de contaminantes como metais, defensivos agrícolas e fármacos, quanto liberar aditivos químicos — como retardantes de chama, pigmentos e plastificantes —, incorporados durante sua produção, no ambiente (GHOMI et al., 2020; WANG et al., 2020a; LAN et al., 2021; LI et al., 2021; MINGJIE et al., 2023; TANG et al., 2023; ZHOU et al., 2024).

Esse polímero, embora seja um contaminante persistente, pode passar por processos de fragmentação resultantes de ações físicas (como abrasão, corte e desgaste), químicas (como a fotodegradação mediada pela reação de Norrish) e biológicas (pela ação de microrganismos, ou por atividades como ingestão, mastigação e movimentação física de animais) (KEFER; FRIEDENAUER; LANGOWSKI, 2022; SOBHANI et al., 2020; WANG et al., 2022a; YAO; SEONG; JANG, 2022; ZHANG et al., 2022; OSMAN et al., 2023; STAPLETON et al., 2023; IONI et al., 2025).

Esses processos dão origem aos chamados microplásticos – embora também possam ser oriundos da própria produção industrial, como microesferas e pellets (OSMAN et al., 2023) –, frequentemente definidos como polímeros sintéticos sólidos com dimensões iguais ou inferiores a 5 mm, geralmente variando entre 1 µm e 5 mm (HARTMANN et al., 2019; BERMÚDEZ; SWARZENSKI, 2021; OECD, 2021; CHAE et al., 2023). Devido às suas dimensões reduzidas, esses elementos podem potencializar os seus efeitos toxicológicos, uma vez que apresentam maior capacidade de permeação entre os tecidos dos organismos, favorecendo processos de bioacumulação e estresse fisiológico, além de atuarem como carreadores e dispersores de aditivos e contaminantes adsorvidos em suas superfícies. (MACLEOD et al., 2021; LI et al., 2023; THOMPSON et al., 2024; YU et al., 2024).

A crescente preocupação com o declínio global de anfíbios, aliado com a ampla distribuição dos microplásticos em ambientes aquáticos e terrestres, fez pesquisadores ao redor do mundo, ao longo da última década, intensificarem seus esforços para elucidar questões relacionadas ao monitoramento de populações de anfíbios, bem como aos efeitos ecotoxicológicos desses poluentes sobre esses vertebrados (ARAÚJO et al., 2021; BURGOS-ACEVES et al., 2022; RAHMAN; KIM; SUNG; 2024). Por outro lado, os ensaios ecotoxicológicos envolvendo microplásticos de polietileno e anfíbios têm se restringido ao grupo dos anuros, especialmente na fase de girinos (RAHMAN; KIM; SUNG; 2024).

Estudos com girinos da espécie *Physalaemus cuvieri*, expostos a microplásticos de polietileno ($35 \pm 18,17 \mu\text{m}$) na concentração de 60 mg/L, durante 7 dias, demonstraram efeitos de bioacumulação em órgãos como fígado, trato digestório, brânquias, músculos e sangue. Além disso, foram registrados danos histopatológicos, aumento de melanóforos na pele e alterações comportamentais, como redução da locomoção e déficit nas respostas defensivas a predadores (ARAÚJO et al., 2020a; ARAÚJO; GOMES; MALAFAIA, 2020b; ARAÚJO; MALAFAIA, 2020c). Em outro estudo, girinos de *Xenopus laevis* expostos ao mesmo tipo de microplástico (34–50 µm), na mesma concentração, durante o desenvolvimento até a fase juvenil,

apresentaram aumento na taxa de crescimento, porém com menor proporção do comprimento focinho-cloaca (SVL), elevação nos níveis de corticosterona, aumento da taxa metabólica e bioacumulação de microplásticos tanto nos girinos quanto nos indivíduos juvenis (RUTHSATZ et al., 2023).

Esses dois exemplos ilustram como os microplásticos de polietileno podem impactar a saúde e o desenvolvimento de anuros. No entanto, permanecem lacunas quanto aos mecanismos biológicos que desencadeiam as respostas observadas e aos efeitos em diferentes espécies de anfíbios. Além disso, a relevância ambiental desses efeitos, observados em condições laboratoriais, reforça a necessidade de novas investigações que considerem contextos ecológicos mais amplos (ARAÚJO et al., 2021; BURGOS-ACEVES et al., 2022).

1.4. Nano partículas de Dióxido de Titânio (TiO₂) e sua relação com os anfíbios

Os nanomateriais ganharam um destaque na última década. Caracterizados por serem estruturas com uma dimensão de 1nm a 100nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011), esses podem ocorrer de maneira natural no ambiente, por processos de degradação, ou, também, podem ser gerados, direta ou indiretamente, pela ação antrópica, na qual são adicionados em cosméticos, fármacos, dispositivos eletrônicos e fotovoltaicos (JACKSON et al., 2013; RIZZO et al., 2013; REED et al., 2014; ROGERS et al., 2018).

Um dos nanomateriais mais amplamente utilizado pela indústria é o dióxido de titânio (TiO₂) (BOUTILLIER et al., 2022; NATIONS et al., 2011). Descoberto por William Gregor, em 1791, nas areias magnéticas preta da Cornualha (WALTON, 1993), o TiO₂ passou a ser comercialmente interessante em meados do século XX, utilizado em uma ampla gama de aplicações, como tintas, cosméticos, aditivo alimentar (denominado E171) e dispositivos eletrônicos (BOUTILLIER et al., 2022; NATIONS et al., 2011). Segundo o estudo de Hendren et al. (2011), apenas os Estados Unidos colaboram com a produção de 7800 a 38000 toneladas nanopartículas de TiO₂ ao ano.

Esse material é amplamente utilizado pela indústria devido às suas propriedades físico-químicas, como altos índice de refração, o que confere a ele a característica de ser um pigmento branco mais eficiente para conferir cor, opacidade e brilho a revestimentos, em tintas (WAGHMODE et al., 2019; SAFARI et al., 2025). Além de suas características ópticas, o TiO₂ atua como filtro contra radiação ultravioleta (UV), protegendo superfícies e substratos da degradação fotoquímica (WAGHMODE et al., 2019; SONG et al., 2022). Sua atividade fotocatalítica também permite a degradação de compostos orgânicos sob exposição à luz, o que

favorece a autolimpeza de superfícies tratadas com esse composto (ALLEN et al., 2005; LU et al., 2015). Ademais, nanopartículas de TiO₂ podem ser empregadas como semicondutores do tipo óxido metálico, apresentando uma banda proibida variando entre 3,01 e 3,2 eV (GE et al., 2023; WANG et al., 2022b).

Apesar de sua versatilidade, as nanopartículas de dióxido de titânio podem desencadear processos ecotoxicológicos em diferentes organismos, devido sua capacidade de interagir com outros contaminantes, servindo como carreador de substâncias químicas, interação com tecidos e células vivas, podendo causar dano estrutural e respostas biológicas de estresse e de defesa, além de serem capazes de produzir espécies reativas de oxigênio, como superóxidos e radicais hidroxila, por meio de reações fotocatalíticas com a luz UV, luz visível, ou até mesmo com ausência de luz por meio da oxidação de proteínas que se aderem à superfície dessas partículas (corona proteica) (MA; BRENNAN; DIAMOND, 2012; JAYARAM et al., 2017; NAASZ; ALTENBURGER; KÜHNEL, 2018; RITACCO et al., 2021; PEREPELITSA et al., 2023).

Em anfíbios, nanopartículas de TiO₂ demonstraram ser capazes de induzir diversas respostas ecotoxicológicas. Em girinos de *Dendropsophus minutus*, nanopartículas de TiO₂ (23,61 ± 2,4 nm), em concentrações de 0,1; 1,0 e 10 mg·L⁻¹, durante sete dias de exposição, foram associadas a danos no DNA, atraso na metamorfose e redução da mobilidade, inclusive na menor concentração testada (AMARAL et al., 2022). Em outro estudo, girinos de *Duttaphrynus melanostictus* submetidos a exposição crônica de 21 dias a nanopartículas de TiO₂ (< 25 nm), em concentrações entre 0,1 e 10 mg·L⁻¹, apresentaram mortalidade significativa e alterações histológicas nos tecidos hepático e intestinal (RUVINDA; PATHIRATNE, 2021). Mais recentemente, Moraes et al. (2025) demonstraram que a exposição conjunta de nanopartículas de TiO₂ com cádmio (10 µg·L⁻¹), por 30 dias, resultou em aumento da taxa de mortalidade de girinos da espécie *Aquarana catesbeiana*, além de causar danos teciduais nas brânquias e redução no tamanho corporal total.

De maneira semelhante aos estudos envolvendo microplásticos de polietileno, as pesquisas ecotoxicológicas com nanopartículas têm se concentrado majoritariamente em anuros, especialmente durante a fase larval (AMARAL et al., 2019b). Isso evidencia uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos biológicos dessas substâncias em outros grupos de anfíbios, como os caudados (salamandras) e gimnofionos (cecílias), representando um campo de pesquisa em aberto para futuras investigações.

2. Justificativa, Relevância do tema

Devido à alta demanda comercial, à grande diversidade de produtos derivados ou que contêm plástico de polietileno e nanopartículas de TiO₂, e à carência de políticas eficazes para o gerenciamento dos resíduos oriundos desses materiais, essas duas classes de substâncias tornaram-se relevantes no estudo dos impactos e riscos ambientais ao longo do tempo — especialmente considerando a atual ameaça global do declínio populacional dos anfíbios.

Embora as pesquisas envolvendo esses dois contaminantes tenham avançado com o tempo — incluindo estudos ecotoxicológicos que buscam compreender os efeitos e os mecanismos de ação dessas substâncias em anfíbios, com predominância de investigações no grupo Anura — (ARAÚJO et al., 2021; BURGOS-ACEVES et al., 2022; RAHMAN; KIM; SUNG, 2024), estudos de campo que determinam suas concentrações no ambiente, bem como os estudos sobre bioacumulação de microplásticos em anfíbios selvagens (IANNELLA et al., 2020; HU et al., 2022; LIU; RUI; YU, 2022; PASTORINO et al., 2023; ZHENG et al., 2025), as pesquisas voltadas ao comportamento e aos efeitos desses materiais combinados permanecem incipientes.

Atualmente, destacam-se os estudos conduzidos por Salla et al. (2024), que investigaram a embriotoxicidade isolada e combinada de nanopartículas de TiO₂ (10 µg/L) e microplásticos de polietileno (60 mg/L) em embriões de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*), após exposição de 96h, e por Jacintho et al. (2025), que avaliaram os efeitos mutagênicos, genotóxicos e imunotóxicos em girinos da mesma espécie, utilizando as mesmas concentrações de exposição, por um período de 15 dias.

No primeiro estudo, observou-se que os microplásticos isolados induziram edemas abdominais nos embriões, enquanto a exposição às nanopartículas, bem como à mistura dos dois contaminantes, resultou em redução nas taxas de sobrevivência e eclosão. Curiosamente, a exposição combinada de microplásticos e nanopartículas levou à redução da embriotoxicidade. No segundo estudo, observou-se que os compostos isolados provocaram efeitos mutagênicos nos girinos, efeito que não foi detectado no grupo exposto à mistura das duas substâncias. Além disso, não foram identificadas respostas genotóxicas ou imunotóxicas significativas em nenhum dos tratamentos, sejam isolados ou combinados.

Esses estudos evidenciam a complexidade das respostas biológicas desencadeadas pela exposição a microplásticos e nanopartículas, uma vez que a interação entre esses contaminantes pode resultar em efeitos distintos mesmo sobre a mesma espécie, dependendo do estágio de desenvolvimento e do tempo de exposição. Tais descobertas reforçam a importância de

considerar abordagens multifatoriais em estudos ecotoxicológicos, uma vez que efeitos isolados nem sempre refletem o que ocorre em exposições combinadas, mais próximas das condições ambientais reais.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar as respostas antioxidantes, por meio das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); os biomarcadores de estresse oxidativo, avaliados pelos níveis de lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO); e os mecanismos de desintoxicação, por meio da atividade da glutathione S-transferase (GST) e da ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), nas brânquias e fígados de girinos de rã-touro expostos a nanopartículas de TiO₂ (10 µg/L) e microplásticos de polietileno (60 mg/L), de forma isolada e combinada, durante um período de 15 dias.

3. Objetivos

O presente projeto de pesquisa tem como principal objetivo avaliar as repostas antioxidantes, de estresse oxidativo e de desintoxicação de uma exposição de 15 dias em girinos de rãs-touro, *Aquarana. catesbeiana* (Shaw, 1802), (a partir do estágio 25 de Gosner), a concentrações de microplásticos de polietileno (60 mg/L, Sigma Aldrich) e de TiO₂ NPs (10 µg/L) em suas formas isoladas e combinadas.

Para alcançar esses resultados, foram adotados os seguintes objetivos específicos:

1. Quantificar a formação de proteínas carbonilas no fígado e brânquias;
2. Quantificar a atividade das enzimas GST, SOD e CAT no fígado e brânquia;
3. Quantificar a relação proteína/massa nas brânquias dos girinos;
4. Quantificar a formação de produtos de lipoperoxidação no fígado;
5. Quantificar a atividade da EROD no fígado.

4. Materiais e Método, Resultados e Discussão

As metodologias empregadas neste trabalho, bem como os respectivos resultados e discussões, serão apresentadas na forma de artigo científico, com o propósito de otimizar a organização dos dados e das análises laboratoriais conduzidas durante o desenvolvimento experimental.

Artigo: “Exposição crônica de Microplásticos de Polietileno e Nanopartículas de Dióxido de Titânio conjugadas induzem respostas antioxidantes e de estresse oxidativo nas brânquias e fígados de girinos de *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802).”

REFERÊNCIAS

ALLEN, N. S. et al. Photocatalytic coatings for environmental applications+. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 2, p. 279-290, 2005.

AMADO, C. D.; PALMA, R. M. M. The Mesoamerican giant toad *Rhinella horribilis* as bioindicator of vegetation degradation in a tropical forest. **Basic and Applied Herpetology**. 2024.

AMARAL, D. F. D. et al. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 600-616, 2019a.

AMARAL, D. F. D. et al. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: a critical review. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 332-344, 2019b.

AMARAL, D. F. D. et al. Titanium dioxide nanoparticles as a risk factor for the health of Neotropical tadpoles: A case study of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 33, p. 50515-50529, 2022.

ARAÚJO, A. P. D. C. et al. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 121066, 2020a.

ARAÚJO, A. P. D. C.; GOMES, A. R.; MALAFAIA, G. Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Fitzinger, 1826). **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, p. 121992, 2020b.

ARAÚJO, A. P. D. C.; MALAFAIA, G. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 391, p. 122214, 2020c.

ARAÚJO, A. P. D. C. et al. Micro (nano) plastics as an emerging risk factor to the health of amphibian: a scientometric and systematic review. **Chemosphere**, v. 283, p. 131090, 2021

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

ASH, L. V. et al. Ranavirus and helminth parasite co-infection in invasive American bullfrogs in the Atlantic forest, Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 23, p. 100924, 2024.

BAMBERGER, E.; TSCHIRNER, F. Ueber die Einwirkung von Diazomethan auf β -Arylhydroxylamine. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 33, n. 1, p. 955-959, 1900.

BERMÚDEZ, J. R.; SWARZENSKI, P. W. A microplastic size classification scheme aligned with universal plankton survey methods. **MethodsX**, v. 8, p. 101516, 2021.

BOONE, M. D. et al. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. **Ecological Applications**, v. 17, n. 1, p. 291-301, 2007.

BOUTILLIER, S. et al. History of titanium dioxide regulation as a food additive: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-17, 2022.

BRAGG, A. N. Decline in toad populations in central Oklahoma. In: **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**. 1952.

BRODEUR, J. C.; CANDIOTI, J. V. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: potential biomonitor/bioindicator species for the Pampa Region of Argentina. In: LARRAMENDI, J. (Ed.). **Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models**. London: Royal Society of Chemistry, p. 163–194. 2017.

BURGOS-ACEVES, M. A. et al. Ecotoxicological perspectives of microplastic pollution in amphibians. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 25, n. 8, p. 405-421, 2022.

BURY, R. B.; WHELAN, J. A. **Ecology and management of the bullfrog**. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1984.

CAMPIÃO, K. M. et al. High prevalence and concomitant infection of *Ranavirus* and *Eustrongylides* sp. in the invasive American Bullfrog in Brazil. **Parasitology International**, v. 100, p. 102875, 2024.

CANNATELLA, D. C.; HILLIS, D. M. Amphibians: leading a life of slime. In: CRACRAFT, J.; DONOGHUE, M. J. (ed.). **Assembling the tree of life**. New York: Oxford University Press, p. 430–450, 2004.

CARVALHO, C. D. 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**, v. 196, p. 110560, 2020.

CARVALHO, C. D. S.; VIDAL, F. A. P. Ecotoxicological Impacts of Metals on Amphibian Tadpoles. In: ALMEIDA, Eduardo Alves de; FREITAS, Juliane Silberschmidt (eds.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 270-302. 2024.

CARVALHO, C. D. S. et al. Use of biomarkers in bullfrog tadpoles *Aquarana catesbeiana* (Shaw 1802) for ecotoxicological evaluation of Pirajibú River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology**, v. 34, n. 1, p. 143-155, 2025.

CATESBY, M. **The natural history of Carolina, Florida, and the Bahama Islands**. Vol. 2. London: Printed for Charles Marsh, Thomas Wilcox and Benjamin Stichall, 1754.

CHAE, B. et al. Is 5 mm still a good upper size boundary for microplastics in aquatic environments? Perspectives on size distribution and toxicological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 196, p. 115591, 2023.

CHAGAS, B. R. C. et al. Metabolic responses in bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 233, p. 108768, 2020.

CHEN, Q. et al. Effects of nitrite exposure on biochemical parameters and liver histopathology in American bullfrogs (*Aquarana catesbeiana*). **Aquaculture International**, v. 32, n. 7, p. 9873-9889, 2024.

CLAYTON, J. III. A continuation of Mr. John Clayton's account of Virginia. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 18, n. 210, p. 121-135. 1694.

COSTA, M. J. et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 153-163, 2008.

COSTA, R. L. D. et al. Toxic, genotoxic, mutagenic, and bioaccumulative effects of metal mixture from settleable particulate matter on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Pollution**, v. 340, p. 122846, 2024.

DAZA, J. D. et al. Enigmatic amphibians in mid-Cretaceous amber were chameleon-like ballistic feeders. **Science**, v. 370, n. 6517, p. 687-691, 2020.

D'AMORE, A. *Rana (Lithobates) catesbeiana* Shaw (American bullfrog). In: FRANCIS, R. A.; HARDWICK, T. **A handbook of global freshwater invasive species**. London: Earthscan, p. 321–330. 2012.

DEMIRORS, M. The history of polyethylene. In: **100+ Years of Plastics. Leo Baekeland and Beyond**. American Chemical Society, p. 115-145. 2011

DODD, C. K. **Frogs of the United States and Canada**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2023.

DUBOIS, A.; OHLER, A.; PYRON, R. Alexander. New concepts and methods for phylogenetic taxonomy and nomenclature in zoology, exemplified by a new ranked cladonomy of recent amphibians (Lissamphibia). **Megataxa**, v. 5, n. 1, p. 1–738-1–738, 2021.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1994.

EL-SHERIF, D. M.; ELOFFY, M. G.; ELMESERY, A.; et al. Environmental risk, toxicity, and biodegradation of polyethylene: a review. **Environmental Science and Pollution Research International**. 2022.

ESTES, R.; WAKE, M. H. The first fossil record of caecilian amphibians. **Nature**, v. 239, n. 5369, p. 228-231, 1972.

EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). **Official Journal of the European Union**. 2011.

EVANS, S. E.; MILNER, A. R.; WERNER, C. Sirenid salamanders and a gymnophionan amphibian from the Cretaceous of the Sudan. **Palaeontology**, v. 39, n. 1, p. 77-96, 1996.

FERNANDES, I. F. et al. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Chemosphere**, v. 275, p. 130000, 2021.

FERNANDES, I. F. et al. Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, (Shaw, 1802). **Chemosphere**, v. 353, p. 141576, 2024.

FRĄTCZAK, M. et al. Assessing species bias in amphibian research on endocrine disruptors: beyond *Xenopus laevis*. **Frontiers in Environmental Science**, v. 13, p. 1556788, 2025.

FREITAS, J. S. Pollutants and oxidative stress in tadpoles. In: ALMEIDA, Eduardo Alves de; FREITAS, Juliane Silberschmidt (eds.). **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 111-132. 2024.

FOX, R. C.; NAYLOR, B. G. A reconsideration of the relationships of the fossil amphibian *Albanerpeton*. **Canadian Journal of Earth Sciences**, v. 19, n. 1, p. 118-128, 1982.

GAO, K. Q.; SHUBIN, N. H. Earliest known crown-group salamanders. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 424-428, 2003.

GAO, K. Q.; SHUBIN, N. H. Late jurassic salamandroid from western liaoning, China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 15, p. 5767-5772, 2012.

GARDNER, J. D. Monophyly and affinities of albanerpetontid amphibians (Temnospondyli; Lissamphibia). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 131, n. 3, p. 309-352, 2001.

GARDNER, T. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. **Animal biodiversity and conservation**, v. 24, n. 2, p. 25-44, 2001.

GAYET, M. et al. Middle Maastrichtian vertebrates (fishes, amphibians, dinosaurs and other reptiles, mammals) from Pajcha Pata (Bolivia). Biostratigraphic, palaeoecologic and palaeobiogeographic implications. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 169, n. 1-2, p. 39-68, 2001.

GE, S. et al. A review on the progress of optoelectronic devices based on TiO₂ thin films and nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 13, n. 7, p. 1141, 2023.

GHOMI, E. R. et al. The flame retardancy of polyethylene composites: from fundamental concepts to nanocomposites. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5157, 2020.

GUILLAUME, A. R. D. et al. Plasticity in the morphology of the fused frontals of Albanerpetontidae (Lissamphibia; Allocaudata). **Historical Biology**, v. 35, n. 4, p. 537-554, 2023.

GREEN, D. M. et al. Amphibian population declines: 30 years of progress in confronting a complex problem. **Herpetologica**, v. 76, n. 2, p. 97-100, 2020.

GRINNELL, J.; STORER, T. I. **Animal life in the Yosemite: an account of the mammals, birds, reptiles, and amphibians in a cross-section of the Sierra Nevada**. University of California Press, 1924.

HARTMANN, N. B. et al. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 3, p. 1039–1047, 2019.

HENDREN, C. O. et al. Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. **Environ Sci Technol**. 2011

HOLMES, B. et al. Who notices Gymnophiona? Google Trends data reveal interesting trends for recent amphibian species. **Ecological Complexity**, v. 58, 2024.

HU, L. et al. Accumulation of microplastics in tadpoles from different functional zones in Hangzhou Great Bay Area, China: Relation to growth stage and feeding habits. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127665, 2022.

IANNELLA, M. et al. Preliminary analysis of the diet of *Triturus carnifex* and pollution in mountain Karst ponds in central Apennines. **Water**, v. 12, n. 1, p. 44, 2020.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **IUCN SSC Amphibian Specialist Group**. Disponível em: <https://iucn.org/our-commissions/group/iucn-ssc-amphibian-specialist-group>. Acesso em: 20 de junho de 2025.

IONI, Y. V. et al. Microplastic production, distribution, and removal from the environment: a review. **Uspekhi Khimii**, v. 94, n. 3, p. 1-23, 2025.

JACINTHO, J. C. et al. Genotoxicity, mutagenicity and immunotoxicity assessment of microplastics and nanoparticle mixture in bullfrog tadpoles. **Environmental Research**, p. 122105, 2025.

JACKSON, P. et al. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 1-21, 2013.

JAYARAM, D. T. et al. Nanoparticle-induced oxidation of corona proteins initiates an oxidative stress response in cells. **Nanoscale**, v. 9, n. 22, p. 7595-7601, 2017.

JIA, J.; GAO, K. Q. A new stem hynobiid salamander (Urodela, Cryptobranchoidea) from the upper jurassic (oxfordian) of liaoning province, China. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 39, n. 2, p. e1588285, 2019.

KAMEI, R. G. et al. Discovery of a new family of amphibians from northeast India with ancient links to Africa. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1737, p. 2396-2401, 2012.

KEFER, S.; FRIEDENAUER, T.; LANGOWSKI, H. C. Characterisation of different manufactured plastic microparticles and their comparison to environmental microplastics. **Powder Technology**, v. 412, p. 117960, 2022.

KLIGMAN, B. T. et al. Triassic stem caecilian supports dissorophoid origin of living amphibians. **Nature**, v. 614, n. 7946, p. 102-107, 2023.

KOPRIVNIKAR, J. et al. Macroparasite infections of amphibians: what can they tell us? **EcoHealth**, v. 9, p. 342-360, 2012.

KRAUS, F. **Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.

KUBOWICZ, S.; BOOTH, A. Biodegradability of plastics: challenges and misconceptions. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 21, p. 12058–12060, 2017.

LAN, T. et al. A comparative study on the adsorption behavior of pesticides by pristine and aged microplastics from agricultural polyethylene soil films. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111781, 2021.

LI, Y. et al. Potential health impact of microplastics: a review of environmental distribution, human exposure, and toxic effects. **Environment & Health**, v. 1, n. 4, p. 249-257, 2023.

LI, J. et al. Insights into phylogenetic relationships and gene rearrangements: complete mitogenomes of two sympatric species in the genus *Rana* (Anura, Ranidae). **ZooKeys**, v. 1216, p. 63, 2024.

LI, M. et al. Impacts of polyethylene microplastics on bioavailability and toxicity of metals in soil. **Science of the Total Environment**, v. 760, p. 144037, 2021.

LIU, Z.; RUI, M.; YU, S. Occurrence of titanium dioxide nanoparticle in Taihu Lake (China) and its removal at a full-scale drinking water treatment plant. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 16, p. 23352-23360, 2022.

LU, Y. et al. Robust self-cleaning surfaces that function when exposed to either air or oil. **Science**, v. 347, n. 6226, p. 1132-1135, 2015.

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

MA, H.; BRENNAN, A.; DIAMOND, S. A. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 2099-2107, 2012.

MACGUIGAN, D. J. et al. Genomic Data Clarify *Aquarana* Systematics and Reveal Isolation-by-Distance Dominates Phylogeography of the Wide-Ranging Frog *Rana clamitans*. **Ichthyology & Herpetology**, v. 110, n. 3, p. 602-617, 2022.

MACLEOD, M. et al. The global threat from plastic pollution. **Science**, v. 373, n. 6550, p. 61-65, 2021.

MARJANOVIĆ, D.; LAURIN, M. A reevaluation of the evidence supporting an unorthodox hypothesis on the origin of extant amphibians. **Contributions to Zoology**, v. 77, n. 3, p. 149-199, 2008.

MARJANOVIĆ, D.; LAURIN, M. Phylogeny of Paleozoic limbed vertebrates reassessed through revision and expansion of the largest published relevant data matrix. **PeerJ**, v. 6, 2019.

MCGOWAN, G.; EVANS, S. E. Albanerpetontid amphibians from the Cretaceous of Spain. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 143-145, 1995.

MCGOWAN, G. J. Albanerpetontid amphibians from the Lower Cretaceous of Spain and Italy: a description and reconsideration of their systematics. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 135, n. 1, p. 1-32, 2002.

MCKEEN, L. W. Introduction to use of plastics in food packaging. In: EBNESAJJAD, S. W. **Plastic films in food packaging**. New York: William Andrew Publishing, p. 1-15. 2013.

MINGJIE, L. V. et al. Effects of heavy metals on the adsorption of ciprofloxacin on polyethylene microplastics: Mechanism and toxicity evaluation. **Chemosphere**, v. 315, p. 137745, 2023.

MONTAZER, Z.; NAJAFI, M. B. H.; LEVIN, D. B. Challenges with Verifying Microbial Degradation of Polyethylene. **Polymers**, Basel, v. 12, n. 1, p. 123–146, jan. 2020.

MORAES, C. A. D. et al. Single and combined chronic toxicity of cadmium and titanium dioxide nanoparticles in *Aquarana catesbeiana* (Anura: Ranidae) tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 279, p. 107246, 2025.

NAASZ, S.; ALTENBURGER, R.; KÜHNEL, D. Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 1170-1181, 2018.

NATIONS, S. et al. Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1053-1061, 2011.

OECD. Policies to Reduce Microplastics Pollution in Water: Focus on Textiles and Tyres, **OECD Publishing**, Paris, <https://doi.org/10.1787/7ec7e5ef-en>. 2021. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/policies-to-reduce-microplastics-pollution-in-water_7ec7e5ef-en.html. Acesso em: 16/ 03/2025.

OECD. Policy Scenarios for Eliminating Plastic Pollution by 2040, **OECD Publishing**, Paris, <https://doi.org/10.1787/76400890-en>. 2024. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/policy-scenarios-for-eliminating-plastic-pollution-by-2040_76400890-en.html. Acesso em: 1/04/2025.

ORAL, E.; MURATOGLU, O. K. Crosslinked polyethylene. In: MURATOGLU, O. K. (Ed.). **Materials for Total Joint Arthroplasty: Biotribology of Potential Bearings**. Elsevier, p. 133–182. 2016.

O'SHEA, M.; MADDOCK, S. **Frogs of the World: A Guide to Every Family**. Princeton University Press, 2024.

OSMAN, A. I. et al. Microplastic sources, formation, toxicity and remediation: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 21, n. 4, p. 2129-2169, 2023.

PASTORINO, P. et al. Microplastics in biotic and abiotic compartments of high-mountain lakes from Alps. **Ecological Indicators**, v. 150, p. 110215, 2023.

PEACOCK, A. Handbook of polyethylene: structures, properties, and applications. Boca Raton: CRC Press, 2000.

PECHMANN, H. V. Ueber diazomethan und nitrosoacylamine. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 31, n. 3, p. 2640-2646, 1898.

PEREPELITSA, A. S. et al. Photosensitising reactive oxygen species with titanium dioxide nanoparticles decorated with PbS quantum dots. **Kondensirovannye sredy i mezhfaznye granitsy= Condensed Matter and Interphases**, v. 25, n. 2, p. 215-224, 2023.

RAGE, J. C. et al. Gymnophionan Amphibia from the Early Paleocene (Santa Lucia Formation) of Tiupampa (Bolivia): the oldest known Gymnophiona. **Revista Tecnica de YPF**, v. 12, p. 3-4, 1991.

RAGE, J. C.; PICKFORD, M. Discovery of a gymnophionan skull (? Caeciliidae, Amphibia) in the early Miocene of Uganda. **Geo-Pal Uganda**, v. 4, p. 1-9, 2011.

RAHMAN, M. M.; KIM, E.-S.; SUNG, H. C. Microplastics as an emerging threat to amphibians: Current status and future perspectives. **Heliyon**, 2024.

REED, R. B. et al. Characterization of nanomaterials in metal colloid-containing dietary supplement drinks and assessment of their potential interactions after ingestion. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 7, p. 1616-1624. 2014.

RE:WILD, SYNCHRONICITY EARTH, IUCN SSC AMPHIBIAN SPECIALIST GROUP. State of the World's Amphibians: The Second Global Amphibian Assessment. Re:wild, Texas. 2023. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/resources/sotwa>. Acesso em: 1/04/2025.

RITACCO, I. et al. Spontaneous production of ultrastable reactive oxygen species on titanium oxide surfaces modified with organic ligands. **Advanced Materials Interfaces**, v. 8, n. 17, p. 2100629, 2021.

RIZZO, Larissa Y. et al. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1159-1166, 2013.

ROELANTS, K.; BOSSUYT, F. Archaeobatrachian paraphyly and Pangaeon diversification of crown-group frogs. **Systematic biology**, v. 54, n. 1, p. 111-126, 2005.

ROGERS, K. R. et al. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. **Science of the Total Environment**, v. 619, p. 1375-1384, 2018.

RUTA, M.; COATES, M. I. Dates, nodes and character conflict: addressing the lissamphibian origin problem. **Journal of Systematic Palaeontology**, v. 5, n. 1, p. 69-122, 2007.

RUTHSATZ, K. et al. Life in plastic, it's not fantastic: sublethal effects of polyethylene microplastics ingestion throughout amphibian metamorphosis. **Science of the Total Environment**, v. 885, p. 163779, 2023.

RUVINDA, K. M. S.; PATHIRATNE, A. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to tadpoles of Asian common toad (*Duttaphrynus melanostictus*) following short term and chronic exposures. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 5, p. 848-854, 2021.

SAFARI, M. et al. Photonic Whitener Pigments: A Sustainable Alternative to Titanium Dioxide Nanoparticles. **Advanced Optical Materials**, v. 13, n. 1, p. 2401983, 2025.

SALLA, R. F. et al. Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1862-1868, 2016.

SALLA, R. F. et al. Microplastics and TiO₂ nanoparticles mixture as an emerging threat to amphibians: A case study on bullfrog embryos. **Environmental Pollution**, v. 346, p. 123624, 2024.

SAN MAURO, D. et al. Life-history evolution and mitogenomic phylogeny of caecilian amphibians. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 73, p. 177-189, 2014.

SANTOS, R. O. et al. The first fossil record of an aquatic caecilian (Gymnophiona: Typhlonectidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 202, n. 2, p. zlad188, 2024.

SCHOCH, R. R. **Amphibian evolution: the life of early land vertebrates**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014.

SHAW, G. K. **General zoology, or Systematic natural history**. Vol. 3. London: Printed for G. Kearsley, 1802.

SIGURDSEN, T.; GREEN, D. M. The origin of modern amphibians: a re-evaluation. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 162, n. 2, p. 457-469, 2011.

SOBHANI, Z. et al. Microplastics generated when opening plastic packaging. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4841, 2020.

SONG, J. et al. Durable radiative cooling against environmental aging. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4805, 2022.

STAPLETON, M. J. et al. Evaluating the generation of microplastics from an unlikely source: The unintentional consequence of the current plastic recycling process. **Science of the Total Environment**, v. 902, p. 166090, 2023.

STOCKER, M. R. et al. The earliest equatorial record of frogs from the Late Triassic of Arizona. **Biology Letters**, v. 15, n. 2, p. 20180922, 2019.

TANG, S. et al. The interfacial behaviors of different arsenic species on polyethylene mulching film microplastics: Roles of the plastic additives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 442, p. 130037, 2023.

THOMPSON, R. C. et al. Twenty years of microplastic pollution research—what have we learned?. **Science**, v. 386, n. 6720, p. ead12746, 2024.

VELDHOEN, N. et al. Effects of acute exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen on the developing North American bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpole. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 17, p. 10439-10447, 2014.

VENTURINO, A. et al. Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, v. 8, n. 3-4, p. 167-186, 2003.

WAGHMODE, M. S. et al. Studies on the titanium dioxide nanoparticles: Biosynthesis, applications and remediation. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 4, p. 310, 2019.

WAGNER, N.; BRÜHL, C. A. The use of terrestrial life-stages of European amphibians in toxicological studies. In: LARRAMENDY, Marcelo L. (ed.). **Ecotoxicology and Genotoxicology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p. 143–162. 2017.

WANG, F. et al. The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 394, p. 122517, 2020.

WANG, Y.; DONG, L.; EVANS, S. E. Polydactyly and other limb abnormalities in the Jurassic salamander *Chunerpeton* from China. **Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments**, v. 96, p. 49-59, 2016.

WANG, Q. et al. Interactions between microplastics and soil fauna: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 18, p. 3211-3243, 2022a.

WANG, J. et al. Synthesis, modification and application of titanium dioxide nanoparticles: a review. **Nanoscale**, v. 14, n. 18, p. 6709-6734, 2022b.

WANG, Z. et al. Enhanced gut damage and microbial imbalance in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeiana*) exposed to polystyrene microplastics under high-temperature conditions. **Environmental Pollution**, p. 126339, 2025.

WALTON, R. E. Titanium dioxide pigments. In: **Surface Coatings: Volume 1 Raw Materials and Their Usage**. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 435-448. 1993.

WILKINSON, M. et al. A nine-family classification of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **Zootaxa**, v. 2874, n. 1, p. 41–64-41–64, 2011.

WYMAN, R. L. What's happening to the amphibians?. **Conservation Biology**, v. 4, n. 4, p. 350-352, 1990.

XU, W. et al. Heritability estimates for growth traits and correlation analysis between weight and metamorphosis rate in the bullfrog *Rana (Aquarana) catesbeiana*. **Fishes**, v. 9, n. 3, p. 105, 2024.

YAO, Z.; SEONG, H. J.; JANG, Y. S. Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113933, 2022.

YU, Y. et al. Various additive release from microplastics and their toxicity in aquatic environments. **Environmental Pollution**, v. 343, p. 123219, 2024.

ZHANG, Y. et al. Interaction of microplastics and soil animals in agricultural ecosystems. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 26, p. 100327, 2022.

ZHENG, R. et al. Distribution and source of titanium dioxide nanoparticles in seawater and sediment from Jiaozhou Bay, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 483, p. 136576, 2025.

ZHUANG, Y.; SEONG, H. J.; JANG, Y. S. Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, art. 113933, set. 2022.

ZHOU, Z. et al. Differential impacts of polyethylene microplastic and additives on soil nitrogen cycling: A deeper dive into microbial interactions and transformation mechanisms. **Science of the Total Environment**, v. 942, p. 173771, 2024.

5. ARTIGO

Exposição crônica de Microplásticos de Polietileno e Nanopartículas de Dióxido de Titânio conjugadas induzem respostas de estresse oxidativo nas brânquias e fígados de girinos de *Aquarana catesbeiana* (shaw, 1802).

5.1. Introdução

Atualmente, os anfíbios são o grupo de vertebrados mais ameaçados ecologicamente, com cerca de 41% de toda diversidade em risco de extinção, onde 798 espécies encontram-se enquadradas como “criticamente ameaçadas” (RE:WILD et al., 2023; IUCN, 2025). Um dos fatores que vêm contribuindo para essa crise global é a poluição, um dos principais fatores associados diretamente a perda de habita, a qual corresponde aproximadamente 93% das causas associadas ao declínio das populações dos anfíbios (RE:WILD et al., 2023; LUEDTKE et al., 2023).

Um dos poluentes que vêm ganhando destaque nos debates públicos, nas agendas políticas internacionais e nos centros de pesquisa são os microplásticos (MPs), frequentemente definidos como polímeros sintéticos sólidos com dimensões ≤ 5 mm, geralmente variando entre 1 μ m e 5 mm (HARTMANN et al., 2019; OECD, 2021; CHAE et al., 2023). Em 2019, das 22 milhões de toneladas métricas (Mt) de plásticos lançados no ambiente, cerca de 3 Mt correspondiam a MPs (OECD, 2022). Embora, em um primeiro momento, esse valor possa corresponder apenas cerca de 12% dos resíduos totais, é esperado que, com o tempo, os macrolásticos passem por processos de degradação e fragmentação, fazendo com que atinjam as dimensões micrométricas, tornando-os poluentes persistentes e complexos de serem gerenciados e sequestrados da natureza (HAHLADAKIS et al., 2018; WELDEN, 2020; MACLEOD et al., 2021; OECD, 2024).

Dentre os plásticos comerciais mais manufaturados pela humanidade, destaca-se o polietileno (PE). Desde a sua descoberta acidental, em 1898, pelo químico alemão Hans von Pechmann (PECHMANN, 1898), o polietileno se transformou em uma matéria-prima versátil e onipresente. Esse plástico é o polímero mais produzido e comercializado no mundo (HORTON et al., 2017), ultrapassando as 90 milhões de toneladas métricas por ano (DEMIRORS, 2011). Entretanto, ecologicamente, e o seu descarte incorreto e a sua degradação no ambiente é capaz de produzir micro e nanoplásticos (MENDOZA et al., 2018), os quais podem agir como poluentes de sistemas aquáticos e desencadear respostas toxicológicas em

anfíbios, como processos de bioacumulação, estresse oxidativo, dano tecidual e alterações no desenvolvimento (KWACH et al., 2020, RAHMAN; KIM; SUNG, 2024).

Outro contaminante que têm despertado interesse entre os cientistas são os nanomateriais. Esses compostos, com dimensões que variam entre 1nm e 100nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011), são empregados na composição de cosméticos, fármacos e dispositivos eletrônicos (JACKSON et al., 2013; RIZZO et al., 2013; REED et al., 2014; ROGERS et al., 2018). As nanopartículas de dióxido de Titânio (TiO₂-NPs) são nanomateriais que desempenham diversas funções comerciais, servindo como pigmento de tintas, auxiliando na formulação de filtros solares, agindo como aditivo alimentar (denominado E171) e como material semiconductor em dispositivos eletrônicos (BOUTILLIER et al., 2022; NATIONS et al., 2011; GE et al., 2023).

Assim como microplásticos, as nanopartículas também podem desencadear processos de estresse oxidativo, dano tecidual nas brânquias e fígado, mutagenicidade e bioacumulação (AMARAL et al., 2019; JACINTHO et al., 2025; MORAES et al., 2025).

Diante dessas circunstâncias, a liberação dessas duas classes de poluentes emergentes no ambiente representa um risco ambiental para a diversidade de anfíbios, dado que concentrações desses dois compostos já foram relatados no ambiente (LIU; RUI; YU, 2022; PASTORINO et al., 2023; TEAMPANPONG; DUENGKAE, 2024). Esse risco decorre não apenas da ação isolada desses compostos, mas também das suas interações com outros contaminantes, sendo capazes de potencializar os seus efeitos toxicológicos (NAASZ; ALTENBURGER; KÜHNEL, 2018; ARAÚJO et al., 2023; MORAES et al., 2025).

Nesse cenário, hipotetizamos que, com o aumento da demanda global de plásticos e nanomaterias para a produção de bens de consumo amplamente usados no cotidiano, a descarga crescente de MPs e NPs no ambiente podem levar ao desequilíbrio dos habitats naturais dos anfíbios, em especial dos girinos – uma vez que, por permanecem restritos ao meio aquático até a metamorfose, esses são especialmente vulneráveis a poluição durante seu desenvolvimento –, deflagrando processos de estresse, mudanças comportamentais e de desenvolvimento, e danos teciduais e moleculares (COOKE, 1981; SQUIRES et al., 2008). Além disso, as interações sinérgicas entre MPs e NPs podem levar a diferentes efeitos toxicológicos (SALLA et al., 2024; JACINTHO et al., 2025).

Logo, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar as respostas toxicológicas de uma exposição crônica (15 dias) de girinos de rãs-touro, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) (a partir do estágio 25 de Gosner (1960), a concentrações ambientalmente relevantes de MPs

de PE (PE-MPs) (60 mg/L, Sigma Aldrich) e de TiO-NPs (10 µg/L) em suas formas isoladas e combinadas.

5.2 Materiais e Métodos

As amostras dos órgãos dos girinos já expostos aos contaminantes, bem como os controles, foram fornecidos a partir da doação do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Ecotoxicologia da Universidade Federal de Goiás (UFG), por meio dos professores Dr. Thiago Lopes Rocha (Universidade Federal de Goiás, UFG) e a Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob (Universidade Federal de Goiás, UFG).

No total foram utilizadas 48 amostras de órgãos, sendo essas divididas entre brânquias, seis amostras controle (Controle), seis expostas a 60 mg/L de PE-MPs, seis expostas a 10 µg/L de TiO-NPs e seis expostas a mistura de ambas as substâncias (PE-MPS+TIO-NPS), e fígado, sendo as mesmas quantidades e os mesmos tratamentos já mencionados. Neste trabalho foram utilizadas as brânquias do lado direito e o lóbulo direito do fígado de cada girino.

O tamanho amostral ($n= 6$, por grupo) encontra-se adequado para as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) brasileiro, em acordo com a resolução normativa Nº 25, de 29 de setembro de 2015, que dispõe sobre o uso de animais em laboratório (BRASIL, 2015).

De acordo com a resolução normativa, o CONCEA estabelece o seguinte cálculo amostral para a adequação de recursos: $E = N - T$, em que:

- **E** representa o tamanho da amostra;
- **N** é o número de indivíduos por tratamento multiplicado pelo número de tratamentos;
- **T** é o número de tratamentos.

Para que a amostra seja considerada adequada, o valor de **E** deve estar entre **10 e 20**.

Neste trabalho, temos:

- **N = 24** (6 indivíduos \times 4 tratamentos);
- **T = 4**;
- Logo, **E = 24 - 4 = 20**.

As amostras dos órgãos foram transportadas congeladas para o Laboratório de Biomarcadores (LaBioM) da Universidade de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba/SP, onde

foram mantidas em eppendorfs devidamente identificados e acondicionadas a -80°C no biofreezer.

Todas as etapas experimentais de exposição foram desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Ecotoxicologia (UFG), sendo aprovadas previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAs) da respectiva Universidade, sob o protocolo N. 073/2022. Também, as análises bioquímicas realizadas no LaBioM se deram após aprovação da CEUA-UFSscar, sob o protocolo N. 4138200624/2024.

5.2.1. *O modelo animal*

A obtenção e a manutenção dos animais foram previamente descritas por Jacintho et al. (2025). No laboratório, os girinos permaneceram em aclimação durante 7 dias (VIDAL et al., 2021) para recuperação do estresse do manuseio e transporte dos animais, os quais foram obtidos no criadouro Laranjeira (Gameleira de Goiás, Goiás, Brasil: 16°20'30,3"S/48°44'17,8"). Durante este período, os girinos permaneceram em condições controladas e estabelecidas como ideais: temperatura = 24 ± 1 °C; água pH = 7 ± 0.5 ; condutividade = 68 ± 1 µS/cm; oxigênio dissolvido > 40% (Medidor Multi-parameter Water DR- 500, Dongrun Co., Ltd, China); níveis de amônia abaixo de 1 mg/L (Teste de Amônia - Sera GmbH- Alemanha); ausência de cloro (Cl test Sera, GmbH- Alemanha); dureza ~ 3 dH (GH teste Sera, GmbH- Alemanha) e fotoperíodo de 12 h claro/ 12 h escuro (ASIH, 2004).

5.2.2. *Delineamento dos ensaios ecotoxicológicos*

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais: um grupo controle (Controle, n = 15 girinos), um grupo exposto à concentração de 60 mg/L (aproximadamente $4,24 \times 10^{-6}$ partículas/m³) de microplásticos de polietileno (PE-MPs, n = 15 girinos), adquiridos comercialmente pela Sigma-Aldrich (com dimensões próximas de 35,46 µm; número CAS: 9002-88-4, e densidade de 0,94 g/mL) (SALLA et al., 2024); um grupo exposto à concentração de 10 µg/L de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO-NPs, n = 15 girinos), adquiridas pela Sigma-Aldrich (CAS: 13463-67-7), e um grupo exposto à combinação de ambos compostos (PE-MPs+TiO-NPs, n = 15 girinos). As dimensões e caracterizações das TiO-NPs utilizadas foram descritas anteriormente por Mamboungou et al. (2022), com as nanopartículas compreendendo um diâmetro de $20,5 \pm 4,2$ nm.

Cada grupo desses foi ensaiado em triplicata (totalizando 45 girinos para cada grupo experimental), dispostos em aquários de vidro de 20 L, e mantidos sob um sistema semi-estático

de exposição (com troca da água a cada um dia) (ARAÚJO et al., 2020). A escolha dessas concentrações baseou-se em estudos prévios que adotaram concentrações ambientalmente relevantes de PE-MPs e TiO-NPs (em suas formas isoladas) em seus experimentos com anfíbios (MARISA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2020; DEDMAN et al., 2021). Dessa forma, o presente estudo mantém um caráter ambientalmente preditivo e reflete condições realistas da poluição ambiental por estes contaminantes.

Durante todo o período de exposição, os animais foram mantidos nas condições de aclimatação (parâmetros de temperatura, pH etc.). Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes (45 % proteínas, 14 % extratos, 5 % fibras, 14% minerais, e 87 % matéria seca) durante o período de exposição. Durante o período de exposição de 15 dias, os animais foram monitorados diariamente para contabilização de mortalidade e identificação do surgimento de quaisquer anormalidades morfológicas externas e comportamentais.

5.2.3. *Ensaio de Exposição*

Para a exposição das réplicas do grupo “PE-MPs”, microplásticos de polietileno (Sigma-Aldrich) foram adicionados diretamente na água declorinada a fim de perfazer a concentração final de 60 mg/L em cada aquário (ARAÚJO et al., 2020). Para a exposição das réplicas do grupo “TiO-NPs”, as nanopartículas foram adicionadas diretamente em água declorinada a fim de perfazer a concentração final de 10 µg/L em cada aquário (MARISA et al., 2018; SALLA et al., 2024). Para a exposição das réplicas do grupo “PE-MPs+TiO-NPs”, ambos compostos foram adicionados nas mesmas concentrações dos grupos anteriores. Às réplicas do grupo controle foi adicionada somente água declorinada. Passados os 15 dias de exposição em sistema semi-estático, ou seja, com troca de 50% do volume de água a cada 48 h, com renovação dos poluentes proporcional à quantidade de água retirada, os animais foram eutanasiados por concussão cefálica, seguindo as determinações da “American Veterinary Medical Association” (AVMA, 2020). Os órgãos foram retirados e congelados a -80 °C, sendo posteriormente transportados para o LaBioM, com as amostras armazenadas em eppendorfs, dentro de uma caixa de isopor com gelo seco.

5.2.4. *Análises Bioquímicas*

Amostras de tecido foram homogeneizadas individualmente com um homogeneizador de tecidos ULTRA-TURRAX®, IKA®T10 basic em dois volumes de tampão fosfato salina (PBS)

– 800 µl para as amostras de fígado e 400 µl para as de brânquia –, contendo 1,365 M de NaCl, 0,027 M de KCl, 0,054 M de Na₂HPO₄ (7H₂O) e 0,018M de KH₂PO₄, pH 7,2 a 4 °C. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g (HERMLE Z 323 K) durante 30 min a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para determinação de proteínas totais (BRADFORD, 1976), utilizando-se como padrão proteico albumina sérica bovina em leituras de microplaca a 595 nm. Todas as análises bioquímicas ocorreram em duplicatas e foram determinadas no leitor de microplacas BioTek Synergy HTX.

A determinação da atividade da ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) foi realizada conforme descrita por Kennedy e Jones (1994) que, em síntese, baseia-se na capacidade do sistema Citocromo P450 associado a enzima CYP1A em converter a etoxiresurofina em resorufina por meio da técnica de fluorescência, na qual é monitorada mediante um filtro de extinção de 530 nm e emissão de 590 nm. A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi aferida com base no ensaio de Keen; Habig e Jakoby (1976), onde a atividade da GST é aferida pela sua capacidade de catalisar a reação do substrato 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em meio a glutathione reduzida (GSH), formando tioéter que pode ser acompanhado cineticamente pelo aumento de absorbância em 340 nm.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) seguiram os protocolos de Flohe et al. (1984) e Aebi (1984), respectivamente. Brevemente, a atividade da SOD é calculada monitorando sua capacidade de inibir a taxa de redução do citocromo C, em 550 nm, por meio do sistema xantina-xantina oxidase como fonte de espécies reativas de oxigênio; enquanto a CAT é avaliada pela sua natureza em catalisar a quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água, sendo verificada pela queda da absorbância em 240 nm.

As análises dos biomarcadores de lipoperoxidação (LPO) e o índice de carbonilação de proteínas (PCO) foram realizadas com base nos trabalhos de Buege e Aust (1978), e Colombo et al. (1994), respectivamente. Resumidamente, a lipoperoxidação foi medida por meio do conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formado pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio, que reagem com o ácido tiobarbitúrico para formar espécies que possuem uma faixa de absorbância em 535 nm; enquanto as concentrações da PCO foram mensuradas a partir da reação de proteínas carboniladas e o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), na qual produzem frações de hidrazonas que podem ser monitoradas a 370 nm.

Neste trabalho, para as amostras de fígado foram avaliados os seis biomarcadores descritos. Para as amostras de brânquia, devido ao baixo volume por amostra, foram estudados

os biomarcadores GST; SOD; CAT e PCO, além disso, foi calculado a razão da quantidade de proteína (mg) pela massa de tecido congelado (mg).

5.2.5. *Análise Estatística*

Devido ao tamanho amostral, foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar os grupos experimentais, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn, e com *p* ajustado por Bonferroni (HARWELL, 1988; KITCHEN, 2009; RAZALI; WAH, 2011). Valores de $P < 0,05$ foram adotados como sendo estatisticamente significativos.

Para identificar os *outliers* foi empregado o teste Q de Dixon (VERMA; QUIROZ-RUIZ, 2006) para cada grupo experimental.

Os índices das respostas integradas de biomarcadores (IBR) foram calculados e os gráficos estrela foram computados para avaliar o comportamento e efeito dos diferentes biomarcadores em respostas aos tratamentos com microplásticos e as nanopartículas (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; RIBEIRO et al., 2021).

Todos os procedimentos estatísticos foram performados utilizando o software R, versão 4.3.3., com os pacotes *tidyverse*; *ggpubr*; *rstatix*; *IBRtools* e *outliers*.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. *Respostas dos biomarcadores nas brânquias dos girinos*

As respostas dos biomarcadores para os quatro tratamentos estão presentes na Figura 1.

A enzima GST não apresentou alterações significativas em nenhum dos tratamentos. As glutionas S-transferase (GSTs) são uma superfamília de enzimas multifuncionais que desempenham papéis importantes na fase II da desintoxicação (ALLOCATI et al., 2018). Elas podem catalisar reações de conjugação da glutiona reduzida (GSH) com agentes eletrofílicos endógenos ou exógenos, facilitando sua posterior eliminação por proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR); e, também, catalisar reações de redução de espécies oxidantes e reativas, utilizando a GSH, que é convertida em sua forma oxidada (GSSG) (LI, 2009; ALLOCATI et al., 2018; UDOMSAK et al., 2024). Devido essas características, a GST é comumente utilizada como um biomarcador adequado para avaliações ecotoxicológicas em anfíbios (VENTURINO; DE D'ANGELO, 2005; CARVALHO et al., 2020; FERNANDES et al., 2024).

Parra et al. (2024), verificaram que bivalves da espécie *Corbicula fluminea* tiveram suas atividades da GST induzidas nas brânquias, na presença de MPs (0,7 mg/L) e Cd (10 µg/L e 15

$\mu\text{g/L}$), isolados e combinados, após uma exposição de 7 dias; entretanto, passados 14 dias, foi notado uma diminuição da atividade da enzima, que se seguiu até o final do experimento (30 dias). Um resultado semelhante foi percebido por Tlili et al. (2020), onde amêijoas da espécie *Donax trunculus*, expostas a MPs de PE e polipropileno (PP) (0,06 g/Kg de areia), tiveram um aumento significativo da GST nas brânquias até o sétimo dia de exposição, e uma redução nos dias 10 e 15.

Apesar dos exemplos anteriores envolverem organismos invertebrados, hipotetizamos que, se em algum momento houve alterações significativas na atividade da GST, essa enzima foi capaz de catalisar as reações de desintoxicação de forma eficiente. Após 15 dias de exposição, os organismos possivelmente conseguiram atingir algum grau de adaptação ao ambiente, a ponto de não necessitarem dessa resposta enzimática exacerbada.

Entretanto, destacamos que são necessários mais estudos, tanto com ensaios agudos, quanto crônicos, para corroborar — ou refutar — essa hipótese, bem como para esclarecer o comportamento da GST frente a esses contaminantes em períodos mais curtos de exposição. Ademais, acreditamos que análises histológicas podem elucidar se há processos de bioacumulação e danos teciduais acarretadas por essas duas substâncias, isoladas e conjugadas, assim como se há o transporte desses produtos pelas brânquias, uma vez que esse órgão pode servir como uma via de entrada de xenobióticos para a corrente sanguínea, e, posteriormente, para outros órgãos (VITT; CALDWELL, 2013 SCHLENK; DE ALMEIDA, 2023).

As brânquias do grupo PE-MPs+TiO-NPs apresentaram um aumento significativo da SOD ($P=0,00167$), em relação às do controle, das atividades enzimáticas avaliadas (Figura 1). A SOD desempenha uma função importante no processo de desintoxicação celular, mais especificamente nas reações de antioxidação, pela presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KEHRER; ROBERTSON; SMITH, 2010; JOMOVA et al., 2024). Ela é responsável por realizar a dismutase de dois ânions superóxidos para uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma de oxigênio molecular (KEHRER; ROBERTSON; SMITH, 2010). Os resultados deste trabalho mostram que, mesmo após 15 dias de exposição, a interação entre microplásticos e nanopartículas nesse órgão continuou a desencadear respostas bioquímicas detectáveis. Isso pode indicar que os organismos ainda estavam respondendo às condições do meio.

Devido à alta permeabilidade e vascularização das brânquias, os microplásticos conjugados com as nanopartículas podem ter se bioacumulado nesse órgão, resultando em um aumento na produção de EROs, seja por meio da interação entre essas duas substâncias, seja

pelos processos de dessorção das nanopartículas na superfície dos microplásticos, e, conseqüentemente, em uma mobilização prolongada do sistema antioxidante dos organismos (VITT; CALDWELL, 2013; CHENG et al., 2017; ROZMAN et al., 2023; SCHLENK; DE ALMEIDA, 2023; LIN et al., 2024).

Embora os resultados obtidos não permitam afirmar que houve uma alteração significativa da catalase nos grupos testes, Shahzad et al. (2022), reportaram que altas doses de NPs de TiO₂ (1,5 mg/L) causam aumento nas atividades da CAT nas brânquias de peixes das espécies *Oreochromis mossambicus*, após 14 dias de exposição. Enquanto Barboza et al. (2018), demonstraram que MPs (0,69 mg/L) isolados, e misturados com mercúrio (0,010 e 0,016 mg/L), também causaram aumento das atividades da CAT nas brânquias de peixes juvenis da espécie *Dicentrarchus labrax*, após exposição aguda de 96h.

Como não houve alteração nos níveis da PCO e de proteínas (Figura 1), isso pode indicar que, mesmo em estresse, o sistema antioxidante dos girinos conseguiu manter as estruturas celulares preservadas, uma vez que altas taxas de carbonilação de proteínas indicam danos oxidativos severos, levando a um comprometimento da integridade estrutural e funcional das próprias proteínas (DALLE-DONNE et al., 2006; FEDOROVA; BOLLINENI, 2014).

A capacidade de diferentes espécies de girinos em biocumular MPs, sejam de origem ambiental, sejam a partir de exposições experimentais, é bem documentada na literatura (HU et al., 2016, HU et al., 2018, KOLENDA; KUŚMIEREK; PSTROWSKA, 2020; HU et al., 2022; ĆIRKOVIĆ; RAKONJAC; AJTIĆ, 2023). Por outro lado, à biocumulação de MPs nas brânquias aparentam ser dependentes de fatores como tamanho dos MPs, tipo de MP, concentração, e a espécies de anfíbio.

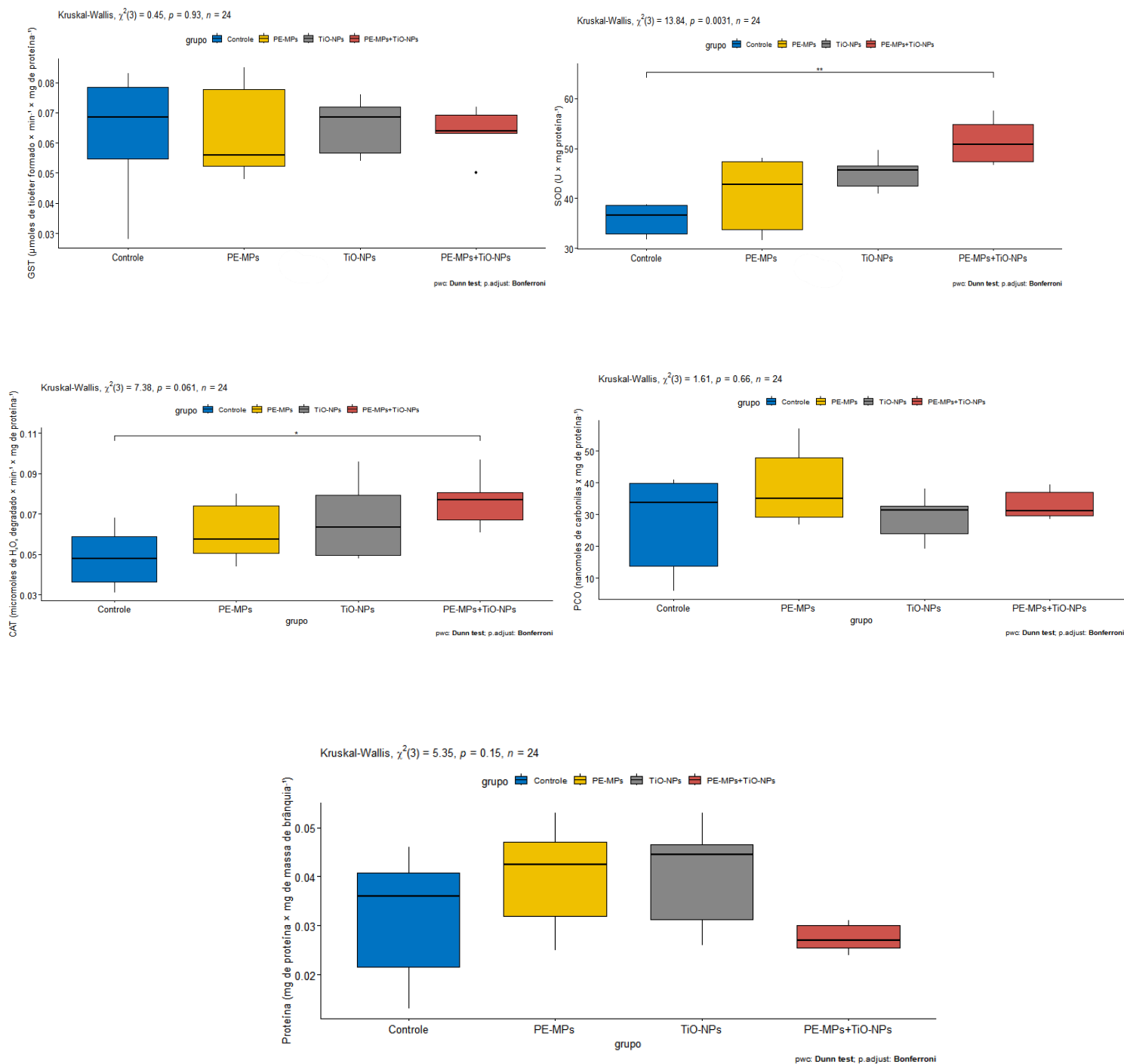


Figura 1. Gráficos boxplots das respostas dos biomarcadores bioquímicos nas brânquias dos girinos expostos com microplásticos de polietileno (60 mg/L) (PE-MPs) e nanopartículas de dióxido de titânio (10 µg/L) (TiO-NPs), isolados e conjugados (PE-MPs+TiO-NPs), após exposição crônica de 15 dias. Com os valores estatísticos de Kruskal-Wallis apresentados no topo de cada gráfico, onde se tem os valores de chi-quadrado com seu respectivo grau de liberdade (df) ($\chi^2(df)$), valor de p, e o número total de observações (n). Os índices de significância estão apresentados com asteriscos; onde, **, $p < 0,01$.

Hu et al. (2016), observaram que girinos de *Xenopus tropicalis* (estágios 45-46, de Nieuwkoop e Faber, 1994) expostos por 1 hora à diferentes concentrações de MPs de poliestireno (PS) - 10, 10³ e 10⁵ partículas/ml (1 µm); 0.1, 10, 10³ partículas/ml (10 µm) -, acumulavam MPs de PS nas brânquias, e que a quantidade de partículas bioacumuladas eram dependentes da dose, mas o tempo de exposição não influenciava a taxa de bioacumulação após esse período. Por outro lado, De Felice et al. (2018) demonstraram que girinos de *Xenopus laevis* (estágio 36, de Nieuwkoop e Faber, 1994; aproximadamente correspondente entre os estágios 25 a 30 de Gosner) criados até o estágio 46, sob concentrações de 1 × 10⁵, 2.833 × 10⁵ e 8.666 × 10⁵ partículas/mL de MPs de PS (3 µm); não apresentavam MPs em suas brânquias no final do experimento. Já Cai et al. (2024), observaram que girinos de *Xenopus laevis* (em estágios 54-56, de Zahn et al., 2022; aproximadamente ~35-41 dos estágios de Gosner), apresentavam MPs de Polietileno tereftalato (PET), levemente intemperizado, (1-100 µm) (100 mg/L) retidos no intestino, fígado, brânquias e rins dos organismos mesmo após 14 dias, com um tempo de exposição de 24h.

Em relação às NPs, recentes estudos demonstraram que esses materiais podem, também, bioacumular em girinos, causando diferentes danos nesses organismos. Murthy et al. (2024), verificaram que girinos da espécie *Duttaphrynus melanostictus* (estágio 26, de Gosner, 1960), após exposição crônica de 30 dias com diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de ferro (20-40 nm) (5 mg/L, 10 mg/L e 50 mg/L); apresentaram bioacumulação em diferentes tecidos (sangue, fígado e rim), sendo essa influenciada pela dose. Além disso, foram observados que as diferentes concentrações de NPs de óxido de ferro causaram danos celulares nos eritrócitos e alterações bioquímicas significativas, todas dependentes da dose.

De Moraes et al. (2025), observaram que uma exposição crônica de 30 dias, com NPs de TiO₂ (20,5 ± 4,2 nm) (10 µg/L), induziu uma simplificação do epitélio nas brânquias de girinos de *Aquarana catesbeiana* (estágio 19, de Gosner, 1960). Nesse trabalho, os autores também verificaram que uma exposição combinada de NPs de TiO₂ e Cádmio (Cd) (10 µg/L) causou um aumento da mortalidade em 60 ± 5% dos girinos, bem como aumento da degeneração tecidual das brânquias.

Também, a combinação de MPs com outros poluentes parece causar diferentes efeitos em girinos, de acordo com a espécie estudada, o(s) tipo(s) de contaminante(s) e a(s) dose(s) aplicada(s). Tang et al. (2024), descobriram que MPs de PS (1,5 µm) (200 µg/L) associados com Cd (50 µg/L), acarretavam o aumento da taxa de mortalidade, alteração da microbiota intestinal e bioacumulação nos órgãos (brânquia, fígado e intestino) de girinos de *Rana*

zhenhaiensis (estágio 26, de Gosner, 1960), quando esses atingiam o estágio 42. Attademo et al. (2023), observaram que girinos de *Rhinella arenarum* (estágio 27-29, Gosner, 1960), expostos a uma mistura de MPs de PE (40–48 µm) (60 mg/L) com Tetrabromobisfenol A (TBBPA) (10µg/l), durante 30 dias, apresentavam alterações bioquímicas significativas (aumentos da carboxilesterase, glutathione redutase, colesterol e tiroxina), além de espessamento da parede intestinal e vacuolização/congestão dos hepatócitos.

Essas evidências ilustram que, devido às intrincadas e complexas relações sinérgicas envolvendo esses contaminantes, isolados ou conjugados, e seus efeitos nos diferentes anfíbios, há uma importância de se estudar diferentes órgãos isoladamente para se entender melhor as dinâmicas envolvidas nessas respostas.

5.3.2. Respostas dos biomarcadores no fígado dos girinos

O ensaio da EROD permite verificar a atividade da CYP1A1, uma das principais enzimas do sistema Citocromo P450 envolvida na primeira fase de desintoxicação, onde ocorre a transformação dos xenobióticos em formas mais eletrofílicas, as quais são posteriormente metabolizadas na segunda fase (WHYTE et al., 2000; ANDROUTSOPOULOS; TSATSAKIS; SPANDIDOS, 2009; MASOOD; KAYANI, 2011). Não foram observadas diferenças das atividades da EROD entre os grupos Controle; PE-MPs; TIO-NPs e PE-MPs+TIO-NPs (Figura 2).

Todavia, Yin et al. (2024), realizaram testes *in vitro* com homogenatos de fígado de tilápias juvenis (*Oreochromis mossambics*) com diferentes concentrações de MP de PS (1-100.000 µg/L), de diferentes dimensões (0,1-10 µm). Após exposição de 48 h, os autores não identificaram diferenças das atividades da EROD em nenhuma das concentrações, entretanto, a combinação de MPs (100 µg/L) com outros elementos (Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, retardante de chamas e fármacos), em diferentes concentrações, levaram à diminuição da atividade da enzima.

Em outro estudo, Zhang et al. (2019) verificaram que o antibiótico roxitromicina (ROX) (50 µg/L), combinado com diferentes concentrações de MPs de PS (0,1 µm) — 1, 10 e 100 µg/L —, produziu respostas distintas da atividade da EROD no fígado de *Oreochromis niloticus* após 14 dias de exposição. Os peixes expostos à ROX com 10 µg/L de MPs apresentaram supressão da atividade da EROD, enquanto as concentrações de 1 e 100 µg/L provocaram um aumento da atividade enzimática.

Embora os MPs e NPs não tenham causado efeitos no fígado dos girinos, os estudos com modelos de peixes indicam que as respostas dessa enzima podem ser sensíveis à interação

de MPs com diferentes contaminantes. No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas sobre essa enzima em estudos com anfíbios, a fim de verificar se a mesma sensibilidade observada em peixes também ocorre nesses vertebrados; uma vez que nossos resultados não detectaram alterações significativas, o que pode indicar uma resistência ou adaptação das espécies em relação aos MPs e NPs após uma exposição crônica.

O grupo PE-MPs+TiO-NPs apresentou uma atividade significativamente maior da GST em relação aos grupos controle ($P= 0,033$) e PE-MPs ($P= 0,0036$). Embora não tenha sido encontrado estudos envolvendo essas duas substâncias em espécies de anuros, ou em outros anfíbios, pesquisas com diferentes organismos têm apresentado resultados semelhantes.

Zhang et al. (2022), ao estudarem os efeitos de NPs de óxido de zinco (ZnO-NPs) e MPs de PE em minhocas da espécie *Eisenia fetida*, observaram que exposições a 1% e 10% (m/m) de microplásticos combinados com diferentes concentrações de nanopartículas (100, 500 e 1000 mg/kg), durante 14 dias, causaram um aumento na atividade da enzima GST. Da mesma forma, o estudo de Jeyavani e Vaseeharan (2023) demonstraram que caramujos da espécie *Pomacea paludosa*, expostos durante 28 dias a uma mistura de ZnO-NPs (10 µg/L) e microplásticos de polipropileno (10 µg/L), apresentaram aumento na atividade da GST.

Embora esses exemplos utilizem organismos evolutivamente distantes dos anfíbios, os autores de ambos os estudos, apontam que a sinergia entre os MPs e as NPs podem intensificar o estresse celular por meio da bioacumulação desses contaminantes nos tecidos dos organismos. Esse processo pode levar a um aumento na produção de EROs e, conseqüentemente, intensificar o estresse oxidativo. Como resultado, há uma maior mobilização e sobrecarga dos sistemas de defesa antioxidante. Nessas condições, o aumento da atividade da GST nos girinos pode ter sido desencadeado pela produção de EROs induzida pela bioacumulação e/ou interação dos MPs e NPs nos tecidos.

Outra enzima que apresentou um aumento da sua atividade foi a SOD, na qual no grupo PE-MPs foi significativamente maior que no grupo controle ($P= 0,0374$) (Figura 2). O aumento da atividade desse biomarcador no grupo PE-MPs pode indicar que, mesmo após 15 dias de exposição, a interação entre os microplásticos e os girinos foi capaz de produzir EROs suficientes para que o efeito se prolongasse por todo o experimento.

Respostas similares também foram observadas no trabalho de Araújo et al. (2023), envolvendo uma mistura de MPs de PE ($2,7 \times 10^8$ partículas /m³) com 14 poluentes diferentes (i. e., defensivos agrícolas, fármacos, surfactantes, etc.), onde os autores demonstraram que girinos de *Physalaemus cuvieri* (estágio 26, de Gosner, 1960) tinham uma redução de eritrócitos

viáveis, maior frequência dessas células em estágios de apoptose, e um aumento das reações de estresse oxidativo, visto o aumento das atividades dos biomarcadores SOD, CAT e acetilcolinesterase (AChE), bem como incremento dos níveis de TBARS, após 30 dias de exposição.

Lin et al. (2024) constataram que girinos de *Xenopus tropicalis* expostos por 7 dias com esse mesmo tipo de microplástico (1 mg/L), tanto nos estados virgens ou sob intemperizações, apresentaram as atividades da SOD aumentadas em decorrência da produção de superóxidos. Razmara et al. (2023), demonstraram que MPs (2 mg/L) associados com NPs de cobre (323 µg/L) causam um aumento do estresse oxidativo que, por sua vez, aumenta a demanda de atividade de enzimas antioxidantes, como a CAT e SOD.

Os níveis de LPO, medidos por meio de TBARS, dos grupos PE-MPs e PE-MPs+TiO-NPs foram significativamente maiores em relação ao controle, (PE-MPs, P= 0,0087) (PE-MPs+TiO-NPs, P= 0,0087). Por outro lado, as concentrações de PCO do tratamento PE-MPs+TiO-NPs demonstraram ser mais acentuadas em relação aos grupos PE-MPs (P= 0,0065) e TiO-NPs (P= 0,0115), mas não ao controle (Figura 1). O processo de LPO é o resultado do dano oxidativo causado por EROs e radicais que atacam as cadeias poli-insaturadas de ácidos graxos, causando perda da integridade de membranas celulares e lipoproteínas (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2022).

Assim como a LPO, as PCOs também são oriundas de processos oxidativos, podendo ser formadas por aldeídos reativos – produtos da lipoperoxidação –, e seus altos níveis são capazes de ocasionar perda funcional de biomoléculas, aumentar as respostas toxicológicas celulares, inflamatórias, e levar a célula à apoptose (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2022). Portanto, esses resultados apontam que os MPs de PE isolados, ou conjugados com as nanopartículas de TiO₂, podem produzir reações que desencadeiam produtos reativos capazes de degradar as cadeias lipídicas celulares do tecido hepático dos girinos e, quando conjugados, levar a carbonização de proteínas.

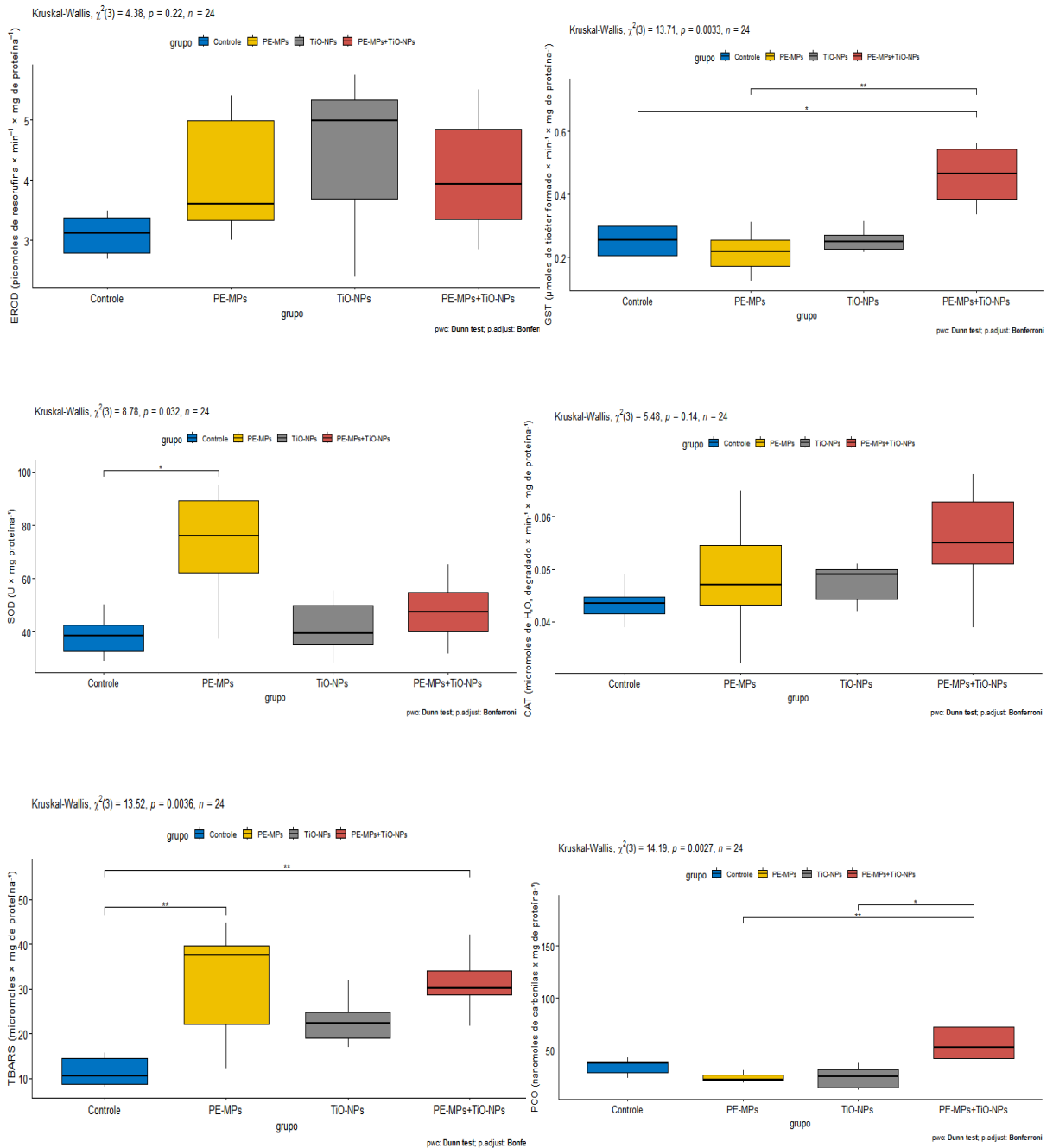


Figura 2. Respostas dos biomarcadores bioquímicos no fígado dos girinos após exposição crônica de 15 dias com microplásticos de polietileno (60 mg/L) (PE-MPs) e nanopartículas de dióxido de titânio (10 μg/L) (TiO-NPs), isolados e conjugados (PE-MPs+TiO-NPs). Com os valores estatísticos de Kruskal-Wallis apresentados no topo de cada gráfico, onde se tem os valores de chi-quadrado com seu respectivo grau de liberdade (df) ($\chi^2(df)$), valor de p, e o número total de observações (n). Os índices de significância estão apresentados com asteriscos; onde, *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$.

Curiosamente, no artigo de Araújo et al. (2023), a exposição isolada de MPs não produziu alterações significativas nos níveis de TBARS. Algumas hipóteses para esse resultado podem estar na diferença nas concentrações utilizadas no experimento, com a concentração empregada em nossa pesquisa próxima de 4.24×10^{-6} partículas/m³, o uso dos animais inteiros, ao invés do estudo individual de cada órgão; tempo de exposição diferente do nosso, com os autores realizando uma exposição de 30 dias, que pode ter levado os organismos a entrarem em homeostase após esse período; bem como a própria particularidade biológica entre as espécies utilizadas. Todavia, para que seja possível corroborar essa hipótese levantada, sugerimos que mais pesquisas devem ser conduzidas, a fim de observar os reais impactos nas respostas produzidas entre diferentes espécies de anuros.

5.3.3. Respostas das Respostas Integradas dos Biomarcadores

A Figura 3 apresenta as respostas integradas dos biomarcadores, para o fígado e brânquias; assim como a Tabela 1 apresenta os índices das respostas para cada órgão.

Grupo	IBRv2 (Fígado)	IBRv2 (Brânquias)
Controle	0,000	0,000
PE-MPs	8,348	5,785
TiO-NPs	5,786	7,123
PE-MPs+TiO-NPs	10,212	7,411

Tabela 1. Valores dos Índices das Respostas Integradas dos Biomarcadores (IBRv2) correspondentes aos tratamentos controle, microplásticos de polietileno (60 mg/L) (PE-MPs); nanopartículas de TiO₂ (10 µg/L) (TiO-NPs); e microplásticos combinados com nanopartículas (PE-MPs+TiO-NPs). Valores calculados com pacote *IBRtools*, com base no referencial de proposto por Sanchez, Burgeot e Porcher (2013).

O IBR é uma ferramenta estatística empregada para se estudar e monitorar, de maneira integrada, as múltiplas respostas de biomarcadores em contextos ecotoxicológicos, bem como na avaliação da contribuição de cada biomarcador para os resultados obtidos (CAO et al., 2023). Embora o IBR não ofereça análises profundas sobre as relações das variáveis, como oferece a Análise das Componentes principais (PCA), e seu emprego se faz complementando uma análise de PCA, ainda é uma opção segura para avaliar o estresse ambiental (SANCHEZ; BURGEOT; PORCHER, 2013; BOUHALLAOUI et al., 2017).

O IBR usado nessa avaliação é a versão *IBRv2*, do pacote *BRtools*, o qual é baseado no trabalho de Sanchez, Burgeot e Porcher (2013); onde os índices são calculados com base no

conceito de desvio de referência - nesse estudo o referencial sendo o grupo controle -, que aumenta a capacidade de discriminação das amostragens, além de levar em conta a regulação positiva e negativa de biomarcadores, fazendo com que essa versão seja estatisticamente mais robusta.

Com relação aos padrões de resposta (Figura 3), os grupos experimentais apresentaram diferenças nas induções e nas depressões das respostas para todos os grupos, bem como para cada órgão.

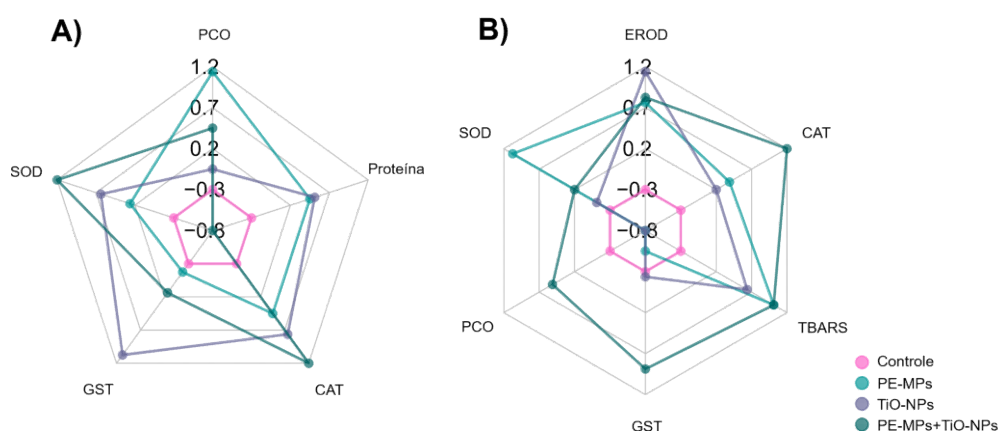


Figura 3. Gráficos estrela dos Índices das Respostas Integradas dos Biomarcadores (IBR) feitas a partir do pacote *IBRtool*, com análise do comando *IBRv2*, a partir da análise proposta por Sanchez, Burgeot e Porcher (2013). As linhas acima de 0 refletem as induções dos biomarcadores, enquanto às abaixo de 0 indicam redução/supressão dos biomarcadores. As cores das linhas representam os tratamentos controle, microplásticos de polietileno (60 mg/L) (PE-MPs) e nanopartículas de dióxido de titânio (10 $\mu\text{g/L}$) (TiO-NPs), isolados e conjugados (PE-MPs+TiO-NPs). A), corresponde ao *IBRv2* gráfico das brânquias; B), corresponde ao *IBRv2* gráfico do fígado.

Nas brânquias (Figura 3A), o grupo tratado com TiO-NPs (roxo) mostrou alterações mais acentuadas em alguns parâmetros, como GST, SOD e CAT; e a exposição combinada (verde escuro) também resultou em alterações acentuadas para SOD, CAT e PCO. No entanto, a intensidade das respostas nos biomarcadores das brânquias foi, em termos totais, menor à observada no fígado, o que pode refletir nas diferenças envolvidas nos processos de bioacumulação e dos mecanismos de defesa antioxidantes entre esses dois órgãos. Com base nos índices IBRv2 é possível observar que em ambos os órgãos, fígado e brânquias, houve respostas maiores para os tratamentos PE-MPs+TiO-NPs em relação as demais exposições, com o fígado apresentando o maior valor de resposta (Tabela 1). Entretanto, as respostas dos grupos

PE-MPs e TiO-NPs isolados foram diferentes para cada órgão, onde os valores no fígado foram maiores para o grupo dos microplásticos; enquanto nas brânquias, as respostas do grupo TiO-NPs foram superiores ao grupo PE-MPs. Esses resultados apontam para a diferença das interações dessas substâncias em cada órgão, ressaltando a importância de analisá-los independentemente.

As brânquias dos girinos são estruturas especializadas em realizar as trocas gasosas e controlar o equilíbrio hidroeletrolítico. Esse órgão é formado pelos arcos e tufos branquiais vascularizados, cuja organização permite uma maior superfície de contato com a água e maior eficiência na difusão dos gases pelas membranas celulares (MCINDOE; SMITH, 1984). Além das características estruturais adaptadas, os girinos também realizam o processo de ventilação branquial, onde o movimento realizado pela cavidade bucal e faringe, permite um fluxo constante de água sobre as brânquias, garantido para o animal uma oxigenação adequada (GRADWELL, 1975; SCHLENK; DE ALMEIDA, 2023). Entretanto, devido essas características de permeabilidade e de contato, as brânquias são um órgão vulnerável a contaminantes. Metais, defensivos agrícolas, microplásticos e nanomateriais são alguns exemplos de xenobióticos que podem acumular e interagir com essas estruturas provocando respostas inflamatórias, histopatológicas, aumento da produção de muco, estresse oxidativo, e degeneração tecidual (BERNABÒ et al., 2008; ARAÚJO et al., 2020; CAI et al., 2024; TANG et al., 2024; DE MORAES et al., 2025).

No fígado (Figura 3), o grupo exposto à combinação de PE-MPs+ TiO-NPs (linha verde escuro) apresentou os maiores desvios nos parâmetros analisados, como CAT, GST, TBARS e EROD; o que indica um nível mais elevado de estresse, possivelmente associado a efeitos sinérgicos entre os contaminantes. Por outro lado, os grupos expostos a PE-MPs (linha azul) e TiO-NPs (linha roxa), separadamente, demonstraram respostas diferenciadas, indicando distintos mecanismos e vias bioquímicas envolvidas para cada contaminante.

O fígado dos girinos é um órgão multifuncional, desempenha importante função de produção e liberação de proteínas para a corrente sanguínea, serve como reserva de gordura, e desempenha respostas fisiológicas e metabólicas essenciais a diversos contaminantes, sendo considerado um órgão de desintoxicação (ZHU et al., 2019; SCHLENK; DE ALMEIDA, 2023). Contudo, sob pressão de determinados contaminantes, micro/nanoplásticos, nitratos, agrotóxicos, metais; esse órgão pode desencadear respostas de estresse oxidativo, deterioração da função hepática, inflamação, fibrose, efeitos histopatológicos e danos metabólicos

(CARVALHO et al., 2017; CHAI et al., 2017; BACH et al., 2018; ARAÚJO; GOMES; MALAFAIA, 2020; YANG et al., 2020; ZANG et al., 2024; LUO et al., 2025).

Logo, estes resultados reforçam a hipótese de que essas substâncias desencadeiam distintas respostas bioquímicas nos diferentes órgãos; bem como, também, podem influenciar as respostas de defesa dos girinos dependendo da maneira em que estão presentes no meio, isoladas ou conjugadas.

5.4. Conclusão

A partir das análises laboratoriais, foi possível concluir que a exposição crônica de girinos expostos a concentração de 60 mg/L de PE-MPs, tanto isolado quanto combinado com TiO-NPs (10 µg/L), foi capaz de induzir diferentes respostas bioquímicas nos tecidos das brânquias e do fígado.

Nas brânquias, a mistura de microplástico e nanopartículas levou a um aumento da SOD, sugerindo uma mobilização do sistema antioxidante diante da presença de EROs. Entretanto, a falta de respostas dos outros biomarcadores pode ser um sinal que os girinos começaram a entrar em processo de adaptação.

No fígado, as respostas foram maiores, com aumento dos níveis dos biomarcadores GST, PCO e TBARS, no grupo PE-MPs+TiO-NPs, e da SOD, no grupo PE-MPs, apontando uma maior sensibilidade desse órgão a esses contaminantes. Além disso, devido à natureza degradativa da carbonilação das proteínas e da lipoperoxidação, é possível que a combinação desses xenobióticos tenha comprometido funções estruturais e funcionais das células; sendo necessário uma investigação mais aprofundada para essa resposta, como análises histomorfológicas.

A análise do *IBRv2* de cada órgão revelou diferentes comportamentos dos biomarcadores para cada tratamento e órgão. Os índices mostram que o fígado apresentou os maiores valores de resposta nos tratamentos com os contaminantes combinados, indicando maior suscetibilidade de efeito de estresse nesse órgão. Já as brânquias, em comparação com o fígado, responderam com menos desvios entre os tratamentos, o que pode indicar uma capacidade desse órgão em deslocar esses xenobióticos para o interior do organismo, causando uma maior circulação e dispersão dos contaminantes.

Desse modo, este estudo também destaca a importância de se avaliar os efeitos de microplásticos e das nanopartículas nas formas isoladas e combinadas, bem como a necessidade de considerar as especificidades de cada órgão na resposta ao estresse químico. Reforça-se

também a necessidade de investigações complementares, com abordagens histológicas e moleculares, para compreender os mecanismos de bioacumulação, transporte e toxicidade desses contaminantes em girinos sobre os demais organismos.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

ALLOCATI, N. et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, p. 8, 2018.

AMARAL, D. F. D. et al. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: a critical review. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 332-344, 2019

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **Report of the AVMA panel on euthanasia. Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 218, p. 669-696, 2020.

ANDROUTSOPOULOS, V. P.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. **BMC cancer**, v. 9, p. 1-17, 2009.

ARAÚJO, A. P. D. C; GOMES, A. R.; MALAFAIA, G. Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Fitzinger, 1826). **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, p. 121992, 2020.

ARAÚJO, A. P. D. C. et al. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 121066, 2020.

ARAÚJO, A. D. P. et al. Toxicity assessment of polyethylene microplastics in combination with a mix of emerging pollutants on *Physalaemus cuvieri* tadpoles. **Journal of Environmental Sciences**, v. 127, p. 465-482, 2023.

ASIH. American Society for Testing and Materials American Society of Ichthyologists and Herpetologists. **Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research**, 2 Ed., HACC. 2004.

ATTADEMO, A. M. et al. Microplastics and plastic additives as contaminants of emerging concern: A multi-biomarker approach using *Rhinella arenarum* tadpoles. **Environmental Advances**, v. 14, p. 100444, 2023.

BACCHETTA, R. et al. Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 4, p. 381-398, 2012.

BACH, N. C. et al. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 202, p. 289-297, 2018.

BARBOZA, L. G. A. et al. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15655, 2018.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.

BERNABÒ, I. et al. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 447-456, 2008.

BOUHALLAOUI, M. et al. Use of biomarkers to evaluate the effects of environmental stressors on *Mytilus galloprovincialis* sampled along the Moroccan coasts: integrating biological and chemical data. **Marine Environmental Research**, v. 130, p. 60-68, 2017.

BOUTILLIER, S.; FOURMENTIN, S.; LAPERCHE, B. History of titanium dioxide regulation as a food additive: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-17, 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Resolução Normativa nº 25, de 29 de setembro de 2015**. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, n. 188, p. 17, 30 set. 2015.

BUCCI, K.; TULIO, M.; ROCHMAN, C. M. What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. **Ecological Applications**, v. 30, n. 2, p.16, 2020.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, p. 302-310.1978.

CAI, B. et al. Ingestion of polyethylene terephthalate microplastic water contaminants by *Xenopus laevis* tadpoles negatively affects their resistance to ranavirus infection and antiviral immunity. **Environmental Pollution**, v. 356, p. 124340, 2024.

CAO, X. Q. et al. Evaluation of physiological stress of grass carp chronically exposed to enrofloxacin based on IBR index. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 8, p. 548, 2023.

CARVALHO, C. S. et al. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 445-452, 2017.

CARVALHO, C. D. 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**, v. 196, p. 9, 2020.

CHAE, Y.; AN, Y. J. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 387-395, 2018.

CHAI, L. et al. Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to Triclosan. **Chemosphere**, v. 182, p. 255-266, 2017.

CHENG, C. et al. Enantioselective bioaccumulation, tissue distribution, and toxic effects of myclobutanil enantiomers in *Pelophylax nigromaculatus* tadpole. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 15, p. 3096-3102, 2017.

ĆIRKOVIĆ, G.; RAKONJAC, A.; AJTIĆ, R. Results of the first analysis of tadpoles' diet and determination of microplastics presence of *Rana*, *Bufo* and *Bufo* species from different localities in Serbia. **Biologica Nyssana**, v. 14, n. 1, p. 31-38, 2023.

COLOMBO, G. et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1019, p. 178-190, 2016.

COOKE, A. S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 25, n. 2, p. 123-133, 1981.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DEDMAN, C. J. et al. Environmentally relevant concentrations of titanium dioxide nanoparticles pose negligible risk to marine microbes. **Environmental Science: Nano**, v. 8, n. 5, p. 1236-1255, 2021.

DE FELICE, B. et al. Polystyrene microplastics did not affect body growth and swimming activity in *Xenopus laevis* tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 34644-34651, 2018.

DEMIRORS, M. The history of polyethylene. In: 100+ Years of Plastics. Leo Baekeland and Beyond. **American Chemical Society**. p. 115-145. 2011.

EL-SHERIF, D. M. et al. Environmental risk, toxicity, and biodegradation of polyethylene: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 54, p. 81166-81182, 2022.

ELVENY, M. et al. A state-of-the-art review on the application of various pharmaceutical nanoparticles as a promising technology in cancer treatment. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 103352, 2021.

EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). **Official Journal of the European Union**. 2011.

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014.

FERNANDES, I. F. et al. Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, (Shaw, 1802). **Chemosphere**, v. 353, p. 141576, 2024.

FLOHE, L. et al. [10] Superoxide dismutase assays. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, p. 93-104. 1984.

GE, S. et al. A review on the progress of optoelectronic devices based on TiO₂ thin films and nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 13, n. 7, p. 1141, 2023.

GRADWELL, N. Experiments on oral suction and gill breathing in five species of Australian tadpole (Anura: *Hylidae* and *Leptodactylidae*). **Journal of Zoology**, v. 177, n. 1, p. 81-98, 1975.

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

HAMMOND, S. A.; CAREW, A. C.; HELBING, C. C. Evaluation of the effects of titanium dioxide nanoparticles on cultured *Rana catesbeiana* tailfin tissue. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 251, 2013.

HARTMANN, N. B. et al. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 3, p. 1039–1047, 2019.

HARWELL, M. R. Choosing between parametric and nonparametric tests. **Journal of Counseling & Development**, v. 67, n. 1, p. 35-38, 1988.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127-141, 2017.

HU, L. et al. Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. **Chemosphere**, v. 164, p. 611-617, 2016.

HU, L. et al. Microplastics in small waterbodies and tadpoles from Yangtze River Delta, China. **Environmental Science & technology**, v. 52, n. 15, p. 8885-8893, 2018.

HU, L. et al. Accumulation of microplastics in tadpoles from different functional zones in Hangzhou Great Bay Area, China: Relation to growth stage and feeding habits. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127665, 2022.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **IUCN SSC Amphibian Specialist Group**. Disponível em: <https://iucn.org/our-union/commissions/group/iucn-ssc-amphibian-specialist-group>. Acesso em: 20 de junho de 2025.

JACINTHO, J. C. et al. Genotoxicity, mutagenicity and immunotoxicity assessment of microplastics and nanoparticle mixture in bullfrog tadpoles. **Environmental Research**, p. 122105, 2025.

JACKSON, P. et al. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 1-21, 2013.

JEYAVANI, J.; VASEEHARAN, B. Combined toxic effects of environmental predominant microplastics and ZnO nanoparticles in freshwater snail *Pomacea paludosa*. **Environmental Pollution**, v. 325, p. 121427, 2023.

JOMOVA, K. et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: Antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. **Archives of Toxicology**, v. 98, n. 5, p. 1323-1367, 2024.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.6183–6188, 1976.

KEHRER, J. P.; ROBERTSON, J. D.; SMITH, C. V. Free radicals and reactive oxygen species. **Comprehensive Toxicology**, p. 277-307, 2010.

KENNEDY, S. W.; JONES, S. P. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 222, n. 1, p. 217-223, 1994.

KITCHEN, C. M. R. Nonparametric vs parametric tests of location in biomedical research. **American Journal of Ophthalmology**, v. 147, n. 4, p. 571-572, 2009.

KOLENDA, K.; KUŚMIEREK, N.; PSTROWSKA, K. Microplastic ingestion by tadpoles of pond-breeding amphibians—first results from Central Europe (SW Poland). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 26, p. 33380-33384, 2020.

KWACH, B. O. et al. Microplastics as emerging contaminants: occurrence, toxicology, and analysis. In: **Effects of Emerging Chemical Contaminants on Water Resources and Environmental Health**. IGI Global. p. 31-44. 2020.

LI, X. Glutathione and glutathione-s-transferase in detoxification mechanisms. **General, Applied and Systems Toxicology**, 2009.

LIN, D. et al. Triclosan-loaded aged microplastics exacerbate oxidative stress and neurotoxicity in *Xenopus tropicalis* tadpoles via increased bioaccumulation. **Science of the Total Environment**, v. 935, p. 173457, 2024.

LIU, Z.; RUI, M.; YU, S. Occurrence of titanium dioxide nanoparticle in Taihu Lake (China) and its removal at a full-scale drinking water treatment plant. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 16, p. 23352-23360, 2022.

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

LUO, S. et al. Nitrate induced hepatic fibrosis in tadpoles of *Bufo gargarizans* by mediating alterations in toll-like receptor signaling pathways. **Environmental Research**, p. 120961, 2025.

MASOOD, N.; KAYANI, M. A. Mutational analysis of xenobiotic metabolizing genes (CYP1A1 and GSTP1) in sporadic head and neck cancer patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 533-538, 2011.

MARISA, I. et al. Bioaccumulation and effects of titanium dioxide nanoparticles and bulk in the clam *Ruditapes philippinarum*. **Marine Environmental Research**, v. 136, p. 179-189, 2018.

MAMBOUNGOU, J. et al. Environmental risk of titanium dioxide nanoparticle and cadmium mixture: developmental toxicity assessment in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 24, n. 9, p. 186, 2022.

MCINDOE, R.; SMITH, D. G. Functional anatomy of the internal gills of the tadpole of *Litoria ewingii* (Anura, *Hylidae*). **Zoomorphology**, v. 104, n. 5, p. 280-291, 1984.

MENDOZA, L. M. Rios et al. Micro (nanoplastics) in the marine environment: Current knowledge and gaps. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 1, p. 47-51, 2018.

MORAES, C. A. D. et al. Single and combined chronic toxicity of cadmium and titanium dioxide nanoparticles in *Aquarana catesbeiana* (Anura: Ranidae) tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 279, p. 107246, 2025.

MURTHY, M. K. et al. Investigating the toxic mechanism of iron oxide nanoparticles-induced oxidative stress in tadpole (*Duttaphrynus melanostictus*): A combined biochemical and molecular study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 107, p. 104432, 2024.

NATIONS, S. et al. Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1053-1061, 2011.

NAASZ, S.; ALTENBURGER, R.; KÜHNEL, D. Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 1170-1181, 2018

NIEUWKOOP, P. D.; FABER, J. **Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis**. 2. ed. New York: Garland Publishing, 1994.

PARRA, S. et al. Impacts of Microplastics, Cadmium, and Their Mixtures on Biochemical Biomarkers in the Freshwater Bivalve *Corbicula fluminea* (Bivalvia, Corbiculidea). **Diversity**, v. 16, n. 12, p. 750, 2024.

PASTORINO, P. et al. Microplastics in biotic and abiotic compartments of high-mountain lakes from Alps. **Ecological Indicators**, v. 150, p. 110215, 2023.

PECHMANN, H. V. Ueber diazomethan und nitrosoacylamine. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 31, n. 3, p. 2640-2646, 1898.

OECD. Policies to Reduce Microplastics Pollution in Water: Focus on Textiles and Tyres, **OECD Publishing**, Paris, <https://doi.org/10.1787/7ec7e5ef-en>. 2021. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/policies-to-reduce-microplastics-pollution-in-water_7ec7e5ef-en.html. Acesso em: 16/ 03/2025.

OECD. Policy Scenarios for Eliminating Plastic Pollution by 2040, **OECD Publishing**, Paris, <https://doi.org/10.1787/76400890-en>. 2024. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/policy-scenarios-for-eliminating-plastic-pollution-by-2040_76400890-en.html. Acesso em: 1/04/2025.

RAHMAN, M. M.; KIM, E.-S.; SUNG, H. C. Microplastics as an emerging threat to amphibians: Current status and future perspectives. **Heliyon**, 2024.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21-33, 2011.

RAZMARA, P. et al. The combined effect of copper nanoparticles and microplastics on transcripts involved in oxidative stress pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 111, n. 4, p. 47, 2023.

REED, R. B. et al. Characterization of nanomaterials in metal colloid-containing dietary supplement drinks and assessment of their potential interactions after ingestion. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 7, p. 1616-1624, 2014.

RE:WILD, SYNCHRONICITY EARTH, IUCN SSC AMPHIBIAN SPECIALIST GROUP. State of the World's Amphibians: The Second Global Amphibian Assessment. **Re:wild**, Texas. 2023. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/resources/sotwa>. Acesso em: 1/04/2025.

RIBEIRO, Y. M. et al. Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 224, p. 112670, 2021.

RIZZO, L. Y. et al. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1159-1166, 2013.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, A. et al. Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1212, 2020.

ROGERS, K. R. et al. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. **Science of the Total Environment**, v. 619, p. 1375-1384, 2018.

ROZMAN, U. et al. A study of the adsorption of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on polyethylene microplastics and their desorption in aquatic media. **Science of the Total Environment**, v. 888, p. 164163, 2023.

SALLA, R. F. et al. Microplastics and TiO₂ nanoparticles mixture as an emerging threat to amphibians: A case study on bullfrog embryos. **Environmental Pollution**, v. 346, p. 123624, 2024.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2721-2725, 2013.

SCHLENK, D.; DE ALMEIDA, E. A. Toxicokinetic Pathways of Environmental Contaminants in Amphibian Tadpoles. In: **Toxicology of Amphibian Tadpoles**. CRC Press, p. 36-62. 2023.

SHAHZAD, K. et al. Study of some toxicological aspects of titanium dioxide nanoparticles through oxidative stress, genotoxicity, and histopathology in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **BioNanoScience**, v. 12, n. 4, p. 1116-1124, 2022.

SQUIRES, Z. E. et al. Environmental deterioration increases tadpole vulnerability to predation. **Biology Letters**, v. 4, n. 4, p. 392-394, 2008.

TAN, L. Y. et al. Aggregation reverses the carrier effects of TiO₂ nanoparticles on cadmium accumulation in the waterflea *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 2, p. 932-939, 2017.

TANG, Y. et al. Toxicity of Polystyrene Microplastics with Cadmium on the Digestive System of *Rana zhenhaiensis* Tadpoles. **Toxics**, v. 12, n. 12, p. 854, 2024.

TEAMPANPONG, J.; DUENGKAE, P. Terrestrial wildlife as indicators of microplastic pollution in western Thailand. **PeerJ**, v. 12, p. e17384, 2024.

THIAGARAJAN, V. et al. Influence of differently functionalized polystyrene microplastics on the toxic effects of P25 TiO₂ NPs towards marine algae *Chlorella sp.* **Aquatic Toxicology**, v. 207, p. 208-216, 2019.

TLILI, Sofiene et al. Microplastics mixture exposure at environmentally relevant conditions induce oxidative stress and neurotoxicity in the wedge clam *Donax trunculus*. **Chemosphere**, v. 258, p. 127344, 2020.

TOMCZAK, M.; TOMCZAK, E. The need to report effect size estimates revisited: an overview of some recommended measures of effect size. **Trends in Sport Sciences**, v. 21, n. 1, p. 19–25, 2014.

UDOMSAK, W. et al. Antioxidant enzymes in cancer cells: their role in photodynamic therapy resistance and potential as targets for improved treatment outcomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3164, 2024.

VENTURINO, A.; DE D'ANGELO, A. M. P. Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology. **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 335-353, 2005.

VERMA, S. P.; QUIROZ-RUIZ, A. Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering. **Revista Mexicana de Ciencias Geológicas**, v. 23, n. 2, p. 133-161, 2006.

VIDAL, F. A. P. et al. Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111101, 2021.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. Water balance and gas exchange. In: **Herpetology**. 4th ed. San Diego, CA: Academic Press, p. 181-202, 2013.

WALTON, R. E. Titanium dioxide pigments. In: **Surface Coatings: Volume 1 Raw Materials and Their Usage**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 435-448, 1993.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.

WONG, H. S. et al. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 41, p. 16804-16809, 2017.

YANG, Y et al. Probing the effects of hexavalent chromium exposure on histology and fatty acid metabolism in liver of *Bufo gargarizans* tadpoles. **Chemosphere**, v. 243, p. 125437, 2020.

YAO, Z.; SEONG, H. J.; JANG, Y. S. Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113933, 2022.

YIN, Y. et al. In vitro impacts of polystyrene microplastics and environmental pollutants on ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione S-transferase activity in *Mossambica tilapia*. **Toxicology in Vitro**, v. 100, p. 105915, 2024.

ZAHN, N. et al. Normal Table of *Xenopus* development: a new graphical resource. **Development**, v. 149, n. 14, p. dev200356, 2022.

ZANG, H. et al. Vital role of oxidative stress in tadpole liver damage caused by polystyrene nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 277, p. 116331, 2024.

ZHANG, S. et al. Interactive effects of polystyrene microplastics and roxithromycin on bioaccumulation and biochemical status in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 1431-1439, 2019.

ZHANG, S. et al. Ecotoxicological effects of polyethylene microplastics and ZnO nanoparticles on earthworm *Eisenia fetida*. **Applied Soil Ecology**, v. 176, p. 104469, 2022.

ZHU, W. et al. Characterizing the composition, metabolism and physiological functions of the fatty liver in *Rana omeimontis* tadpoles. **Frontiers in Zoology**, v. 16, p. 1-17, 2019.