

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CAMILA SENA DOS SANTOS

**BIOMARCADORES NO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*, SHAW, 1802): EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MICROPLÁSTICO DE POLIETILENO E NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ISOLADOS E CONJUGADOS**

Sorocaba

2025

**CAMILA SENA DOS SANTOS**

**BIOMARCADORES NO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*, SHAW, 1802): EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MICROPLÁSTICO DE POLIETILENO E NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ISOLADOS E CONJUGADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Sorocaba

2025

Santos, Camila Sena dos

Biomarcadores no fígado de girinos de rã-touro (Aquarana catesbeiana, Shaw, 1802): efeitos da exposição ao microplástico de polietileno e nanopartículas de dióxido de titânio isolados e conjugados / Camila Sena dos Santos – 2025. 34f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Cleoni dos Santos Carvalho

Banca Examinadora: Fernanda Gomes Leite, Bruno

Serra de Lacerda Valverde

Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Contaminantes emergentes. 3. Fígado de girinos. I. Santos, Camila Sena dos. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979

**Folha de aprovação**


Camila Sena dos Santos

**“Biomarcadores no fígado de girinos de rãs-touro (*Aquarana catesbeiana*, Shaw, 1802):  
efeitos da exposição ao microplástico de polietileno e nanopartículas de dióxido de titânio  
isolados e conjugados ”**

Trabalho de Conclusão de Curso


Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba

Sorocaba, 04 de julho de 2025.

Documento assinado digitalmente  
 **CLEONI DOS SANTOS CARVALHO**  
Data: 04/07/2025 11:23:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Orientadora

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Documento assinado digitalmente  
 **FERNANDA GOMES LEITE**  
Data: 04/07/2025 11:40:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 1

\_\_\_\_\_  
Dra. Fernanda Gomes Leite

Documento assinado digitalmente  
 **BRUNO SERRA DE LACERDA VALVERDE**  
Data: 04/07/2025 12:39:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 2

\_\_\_\_\_  
Dr. Bruno Serra de Lacerda Valverde

*Dedico este trabalho aos maiores  
incentivadores e encorajadores dos meus  
estudos, meus pais, Ebnilza e Francisco.*

*Ele revela o profundo e o escondido e conhece o que está em trevas; e com Ele mora a luz.*

(Daniel 2:22)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Senhor e Deus pelo Seu sopro (פּוּר), o primeiro que me deu fôlego e o segundo que me deu Vida. Nada poderia fazer sem Ele. A Biologia (βίολογος) é ainda mais significativa quando penso que são as obras de um bondoso Criador.

Agradeço à minha mãe Ebnilza, ao meu pai Francisco e ao meu irmão Bruno, pelo amor, baluarte, incentivo, sustento e encorajamento em toda minha trajetória acadêmica. Não deixo de mencionar um pequeno membro não humano da família cuja companhia foi lenitiva para mim, meu Liro. Estendo minha gratidão aos meus parentes baianos, de quem sinto muita saudade. Sou grata a Deus pela família que Ele graciosamente me presenteou, eu amo vocês.

Agradeço a minha professora orientadora Dra. Cleoni Carvalho, que aceitou me orientar e o fez paciente e cuidadosamente.

Agradeço ao Gabriel Hiroshi, quem considero como meu segundo orientador, por ter tirado tantas dúvidas e sempre com muita disposição para me auxiliar.

Agradeço aos meus amigos que fiz ao longo do curso, pela companhia, conversas, risadas e ajuda ao longo dos semestres que vivemos juntos. Agradeço às minhas queridas amigas de Fortaleza e Salvador e aos meus amigos da Aliança Bíblica Universitária, de Sorocaba, Lorena, ABC, São Paulo, Teresina, Parnaíba, Montes Claros, Itajubá, Araguaia, Goiânia, Seropédica e São Carlos, que foram meu apoio e minha alegria.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa pela concessão da bolsa e pela aprovação do projeto.

E, por fim, agradeço à UFSCar pelas oportunidades de pesquisa, extensão e ensino ao longo dos últimos quatro anos. Há 15 anos, uma pequena soteropolitana teve seu contato com Ciências pela primeira vez, e desde então, após Clubinhos de Ciências e Olimpíadas, em Fortaleza, essa área do conhecimento sempre esteve em sua vida. É uma honra agora poder ser graduada em Ciências Biológicas.

**Resumo**

Os microplásticos e as nanopartículas de dióxido de titânio são poluentes emergentes que têm impactado negativamente diversas espécies de seres vivos, por meio de seus efeitos tóxicos aos órgãos, no desenvolvimento e no desempenho desses organismos. Um grupo de vertebrados que tem recebido pouca atenção nesta questão são os anfíbios, os quais caracterizam-se por serem excelentes bioindicadores. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de glicose, triglicerídeos e proteína após exposição crônica de microplásticos de polietileno e de nanopartículas de dióxido de titânio no fígado de girinos de rã-touro. Os girinos foram expostos por 21 dias ao microplástico de polietileno (grupo MP de PE, 60 mg/L), às nanopartículas de dióxido de titânio (grupo NP de TiO<sub>2</sub>, 10 µg/L) e à combinação de ambos compostos (grupo MP+NP). Os dados obtidos revelaram, em geral, ausência de diferença significativa na concentração dos componentes bioquímicos analisados, sugerindo adaptabilidade desses animais às condições adversas às quais foram submetidos. Estudos como este podem servir como base na compreensão dos efeitos tóxicos a esses animais, como biomonitoramento, o que marca a relevância de tais resultados não apenas para o grupo de organismos analisados, os anfíbios, mas também para estudos acerca do impacto de tais contaminantes em outros grupos de seres vivos.

**Palavras-chave:** ecotoxicologia, contaminantes emergentes, anfíbios.

**Abstract**

Microplastics and titanium dioxide nanoparticles are emerging pollutants that have negatively impacted several species of living beings through their toxic effects on organs, development, and performance. One group of vertebrates that has received little attention on this issue is amphibians, which are characterized by excellent bioindicators. Therefore, the objective of this study was to evaluate glucose, triglyceride, and protein levels after chronic exposure to polyethylene microplastics and titanium dioxide nanoparticles in the livers of bullfrog tadpoles. The tadpoles were exposed for 21 days to polyethylene microplastics (PE MP group, 60 mg/L), titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NP group, 10 µg/L), and the combination of both compounds (MP+NP group). The data obtained generally revealed no significant differences in the concentrations of the biochemical components analyzed, suggesting these animals' adaptability to the adverse conditions to which they were subjected. Studies like this can serve as a basis for understanding the toxic effects on these animals, such as biomonitoring, which highlights the relevance of such results not only for the group of organisms analyzed, amphibians, but also for studies on the impact of such contaminants on other groups of living beings.

**Keywords:** ecotoxicology, emerging contaminants, amphibians.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABS	Absorbância
BG-250	Coomassie Brilliant Blue G-250 (Azul brilhante de Coomassie)
BSA	Bovine Serum Albumin (em português, Albumina do Soro Bovino)
C	Celsius
cm	Centímetro
dH	Deionizada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
g	Gramma
gl	Graus de liberdade
h	Hora
H <sub>2</sub> O	Água destilada
IUCN	International Union for Conservation of Nature (em português, União Internacional para Conservação da Natureza)
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
L	Litro
M	Massa molar
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MP	Microplástico
NaCl	Cloreto de Sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
nm	Nanômetro
NP	Nanopartículas
PBS	Phosphate-Buffered Saline (em português, solução salina tamponada com fosfato)
PE	Polietileno
pH	Potencial hidrogeniônico
Ref.	Referência
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio

**LISTA DE SÍMBOLOS**

°	Graus
%	Porcentagem
F	Teste F (razão entre as variâncias Teste Levene)
p	p-value
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
X <sup>2</sup>	Qui-quadrado
μS	Microsiemens
μ	Micro (10 <sup>-6</sup> )

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Obtenção dos órgãos dos girinos já expostos aos contaminantes.....</i>	17
3.2. <i>Delineamento experimental.....</i>	17
3.3. <i>Obtenção do homogeneizado.....</i>	18
3.4. <i>Método de análise.....</i>	19
3.4.1. <i>Quantificação da concentração de proteína.....</i>	19
3.4.2. <i>Quantificação da concentração de glicose.....</i>	19
3.4.3. <i>Quantificação da concentração de triglicerídeos.....</i>	20
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>20</b>
4.1. Proteínas.....	20
4.2. Glicose.....	23
4.3. Triglicerídeos.....	25
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>28</b>

## 1. Introdução

Desde o início da civilização humana, o ambiente aquático tem sofrido com poluição e contaminação de suas águas, o que tem, inegavelmente, trazido diversas consequências aos ecossistemas e aos organismos que nele habitam (Freire et al., 2008), como a redução de suas populações, o que tem ocorrido de maneira acentuada e alarmante com os anfíbios (Salla et al., 2023), uma vez que mais de 40% das espécies categorizadas pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza, *Red List of Threatened Species*) estão em risco de extinção (IUCN, 2023; Jacinto et al., 2025). Com o avanço da industrialização, tais animais são ainda mais ameaçados em decorrência de fatores como a perda e fragmentação de seus habitats, aumento da radiação ultravioleta, e, sobretudo, devido à presença de contaminantes aquáticos, os quais, tanto isolados quanto conjugados, podem trazer inúmeras consequências celulares, fisiológicas e ecológicas a tais populações (Jones-Costa et al., 2018).

Com o intenso crescimento econômico e produção de bens, bem como com o avanço da urbanização, atividades industriais, agrícolas e domésticas têm sido responsáveis pelo uso de mais de um terço da água doce acessível e têm-se constituído como uma das principais causadoras de contaminação dessas águas por compostos sintéticos (Fran et al., 2008; Tran et al., 2024). Dentre esses contaminantes, destacam-se os nanomateriais, os quais caracterizam-se por serem estruturas que apresentam uma dimensão dentro da faixa de 1 a 100 nanômetros (nm) e que podem estar presentes no meio ambiente tanto por ocorrência natural, quanto por consequência de atividades ou produtos antrópicos (Salla et al., 2023).

Um destes nanomateriais são as partículas de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), que são utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica (Salla et al., 2023; Tran et al., 2024), devido à sua estabilidade em sistemas biológicos e à sua atividade fotocatalítica na eliminação de bactérias (Betancur Henao et al., 2016; Khan et al., 2025). Trata-se de um material amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, e em todas essas indústrias já encontram-se registros de produtos com nanopartículas (Pereira, 2010; Tran et al., 2024). Devido a esse vasto uso, a ocorrência de descarte inapropriado também é uma realidade, o que faz com que tais poluentes contaminem os ambientes aquáticos (Sun et al., 2023; Salla et al., 2023), possibilitando que os organismos interajam com tais nanopartículas, resultando em transformações biológicas, e contribuindo para que a toxicidade desses materiais afete diversos níveis tróficos de vários organismos, como os anfíbios (Amaral et al., 2022; De Moraes et al., 2025).

Ademais, outro poluente que têm ganhado destaque são os microplásticos, devido à sua recém descoberta, a qual ocorreu em 1972, em que houve o primeiro relato desses materiais

em redes de plâncton, em águas costeiras na região da Nova Inglaterra, Estados Unidos (Montagner et al., 2021). Microplásticos são derivados da degradação dos plásticos, materiais sintéticos versáteis que são produzidos em alta escala atualmente (Souza et al., 2022). Em decorrência de diversas características economicamente viáveis, como a alta durabilidade, leveza, transparência, maleabilidade, impermeabilidade e, principalmente, devido ao seu baixo custo, os plásticos são intensamente utilizados (Olivatto, 2018; Jacintho et al., 2025). Contudo, o descarte impróprio de tais materiais é uma grande problemática na atualidade, uma vez que promove impactos negativos aos ecossistemas, e, conseqüentemente, ao ser humano (Boyero et al., 2020). Os microplásticos são gerados devido à degradação dos plásticos em partículas menores, de até 5 mm, e eles são ainda mais reativos e perigosos para a fauna aquática, incluindo os anfíbios, um grupo intensamente afetado (Lajmanovich et al., 2022). Estudos recentes têm mostrado que a exposição animal a microplásticos desencadeia diversos efeitos tóxicos, como interrupção da alimentação, desempenho reprodutivo, distúrbios no mecanismo energético, hepatotoxicidade, entre outros (Araújo; Malafaia, 2021; Salla et al., 2023; Jacintho et al., 2025).

Uma das maneiras de se mensurar os impactos dos poluentes na qualidade ambiental e nos organismos que habitam tais ecossistemas é por meio de biomarcadores (Freire et al., 2008; Araújo et al., 2020). Eles são comumente utilizados para monitorar os efeitos de substâncias tóxicas no ambiente e nos organismos vivos e apresentam diferentes categorias, como biomarcadores moleculares, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais, sendo utilizados em diversos níveis de organização biológica, desde organismos individuais até populações (Jemec et al., 2008). Tem-se havido grande necessidade do estudo de tais indicadores devido à intensa e sem precedentes poluição do meio ambiente na atualidade. Tendo isso em vista, constata-se a importância de se observar os efeitos toxicológicos que podem ocorrer a nível molecular ou bioquímico, por meio de tais biomarcadores, que possibilitam a identificação desses impactos ambientais (Santana et al., 2018). Para que seja possível analisar esses efeitos, o fígado destaca-se como um importante órgão responsável pela biotransformação de xenobióticos, portanto, alterações hepáticas configuram-se como indicadores de exposição e contaminação por contaminantes no ambiente aquático (Jones-Costa et al., 2018). Assim, o fígado foi selecionado como órgão alvo analisado neste trabalho, uma vez que este, além da supracitada função de biotransformação, também possui indispensável função metabólica, responsável por mediar a absorção, digestão, síntese e armazenamento de vários componentes bioquímicos. Ademais, este órgão também desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase energética biológica, bem como é considerado o centro do metabolismo lipídico e da secreção

de sais biliares (Nogueira et al., 2017). Portanto, alterações na histopatologia hepática podem indicar efeitos adversos dos poluentes ambientais em sua função. Efeitos toxicológicos comuns são atrofia nuclear hepática, congestão sinusal e aumento anormal dos espaços intercelulares (Chen et al., 2023).

Outrossim, por meio dos experimentos laboratoriais, é possível que haja aprimoramento do conhecimento sobre a temática em questão, por permitir o controle de diversas variáveis (Araújo; Malafaia, 2021). Portanto, os experimentos permitem a avaliação dos impactos dos contaminantes estão presentes nos ambientes aquáticos, a saber, os microplásticos e as nanopartículas de dióxido de titânio, sobre as comunidades de organismos neles existentes, como os anfíbios (Jacintho et al., 2025). Nesse sentido, estudos procedentes com tal metodologia em tais seres vivos configuram-se como uma alternativa acessível e viável para obtenção de resultados capazes de ampliar o conhecimento acerca dos efeitos ecotoxicológicos dos poluentes mencionados, embora tal extrapolação deva ser feita cautelosamente (Araújo; Malafaia, 2021).

Para avaliar os efeitos dos contaminantes em questão, pode-se utilizar algumas espécies ou grupos de espécies comuns como sistema modelo como uma ferramenta de pesquisa, comumente utilizada em ecologia e ecotoxicologia. Além disso, existe um compromisso da comunidade científica mundial (European Commission, 2011) em seguir os Princípios dos 3Rs, de “redução, substituição (replacement) e refinamento” no uso de animais, aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a resolução normativa 17, que dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em atividade de pesquisa (Brasil, 2009).

Para este trabalho, os anfíbios foram selecionados como bioindicadores para avaliar os efeitos toxicológicos das partículas de microplásticos (MP) e dióxido de titânio (NP de  $TiO_2$ ). Os anfíbios devem receber especial atenção devido à queda abrupta em suas populações nas últimas décadas, como já mencionado (Falfushynska et al., 2015; Lajmanovich et al., 2022). Tais organismos exercem papel relevante no ecossistema aquático, uma vez que dependem desse ecossistema tanto na fase larval quanto na fase adulta (Fernandes et al., 2021; Amaral et al., 2022). Por possuírem pele fina e permeável, esses animais, principalmente os girinos, são ainda mais suscetíveis aos contaminantes, pois nascem e se desenvolvem em águas superficiais. Ademais, quando comparados aos demais vertebrados ectotérmicos, nota-se que o metabolismo de larvas de anuros é menor do que o observado em aves e mamíferos, favorecendo menores taxas de catabolismo e depuração, o que permite maior bioacumulação

de poluentes (Jones-Costa et al., 2018). Outrossim, por passarem por metamorfose entre suas fases de vida, que envolve transformações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais que preparam o animal para o ambiente terrestre, a sensibilidade dos estágios iniciais da vida dos anfíbios à poluição ambiental os torna bons bioindicadores para determinar os efeitos de contaminantes ambientais.

No presente trabalho, foi escolhida a espécie *Aquarana catesbeiana* (syn. de *Lithobates catesbeianus*), que se caracteriza por ser uma espécie nativa da América do Norte, a qual passou a ser introduzida no país para fins comerciais, cuja biologia é bem conhecida entre os anfíbios e possui grande capacidade adaptativa a qualquer ambiente, facilitando o seu manejo em testes em laboratório. Trata-se de uma espécie que, ao ser submetida à exposição de tóxicos, apresenta padrões responsivos muito similares entre os indivíduos (Ouellet, 1997; Nogueira et al., 2017). A *A. catesbeiana* é uma rã caracterizada por pertencer à família Ranidae e ter pequenas lagoas e charcos de água estacionada como seu habitat, o que permitiu uma boa adaptação dessa espécie às condições climáticas das regiões neotropicais do planeta, possibilitando sua distribuição em países sul-americanos como o Brasil (Ferrez, 2021).

Além disso, estudos recentes acerca da transferência trófica de microplásticos entre os organismos de água doce constataram que a aderência dessas partículas ao perifiton, o qual é ingerido pelos girinos, levou a consequências negativas ao funcionamento dos ecossistemas dulcícolas e às comunidades de anfíbios a longo prazo (Araújo; Malafaia, 2021). Os resultados do estudo sugeriram que os microplásticos podem ser uma importante fonte de estresse para os anfíbios, os quais também podem atuar como transferidores dos contaminantes de ecossistemas de água doce para os ecossistemas terrestres (Araújo; Malafaia, 2021; Jacintho et al., 2025).

Assim, os resultados obtidos nesta pesquisa terão grande relevância ecológica ao representar uma base inicial para a compreensão dos riscos toxicológicos dos microplásticos e nanopartículas, os quais poderão ser extrapolados e comparados posteriormente com outras espécies. Diante do exposto, o presente estudo somou-se aos demais, demonstrando que a exposição ao microplástico de polietileno e às nanopartículas de dióxido de titânio causam efeitos tóxicos no fígado de girinos de rã-touro após exposição crônica, evidenciando o risco potencial destes contaminantes emergentes na saúde dos vertebrados aquáticos.

## **2. Objetivos**

Como parte deste estudo, os objetivos são avaliar as respostas toxicológicas da exposição crônica (21 dias) de girinos de rã-touro (a partir do estágio 25 de Gosner), a concentrações

ambientalmente relevantes de microplásticos de polietileno (60 mg/L, Sigma Aldrich) e de NP de TiO<sub>2</sub> (10 µg/L) em suas formas isoladas e combinadas.

Para alcançar esses resultados, o objetivo específico foi analisar os níveis de glicose, triglicerídeos e proteína no fígado dos girinos, a fim de compreender as consequências da exposição a concentrações ambientalmente relevantes de tais contaminantes.

### **3. Metodologia**

#### ***3.1. Obtenção dos órgãos dos girinos já expostos aos contaminantes***

Os girinos de rã-touro foram expostos aos microplástico de polietileno e as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e o material biológico coletado foi doado pelo Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha e pela Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Ecotoxicologia da Universidade Federal de Goiás (UFG) para realização das análises em questão.

Os animais foram expostos a 60 mg/L de microplástico de polietileno e a 10 µg/L de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Todas as etapas experimentais, que ocorreram no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Ecotoxicologia (UFG), foram aprovadas previamente pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição correspondente, sob o protocolo N. 073/22.

As amostras dos órgãos foram transportadas congeladas e acondicionadas a -80°C no biofreezer para o laboratório onde a pesquisa foi realizada, o qual foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSCar) processo de número 4138200624 e foi aprovado em agosto de 2024.

#### ***3.2. Delineamento experimental***

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo controle (n = 15 girinos), grupo exposto à concentração de 60 mg/L de MP de PE (n = 15 girinos), grupo exposto à concentração de 10 µg/L de NP de TiO<sub>2</sub> (n = 15 girinos), e grupo exposto à combinação de ambos compostos (MP+NP, n = 15 girinos). A exposição foi feita em triplicata (totalizando 45 girinos para cada grupo experimental) em aquários de vidro de 20L, sob sistema semi-estático de exposição (com troca da água a cada um dia) (Araújo et al., 2020). Durante todo o período de exposição, os animais foram mantidos nas mesmas condições de aclimação (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 experimental de 21 dias, os animais foram

monitorados diariamente para contabilização de mortalidade e identificação do surgimento de quaisquer anormalidades morfológicas externas.

As concentrações utilizadas para os testes se basearam nos estudos de Araújo et al., (2020) para os grupos MP de PE (concentração final de 60 mg/L) e Nations et al. (2011) e Bacchetta et al. (2012) para os grupos NP de TiO<sub>2</sub> (concentração final de 1000 mg/L por aquário). Os grupos controle receberam somente água declorinada.

Durante o período de aclimação e na água de exposição e do controle as condições da água foram controladas e estabelecidas tais como: temperatura =  $24 \pm 1$  °C; água pH =  $7 \pm 0,5$ ; condutividade =  $68 \pm 1$  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 (teste Sera GmbH- Alemanha) e fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro de acordo com a American Society for Testing and Materials (ASTM, 2000).

Após o período de exposição (21 dias) 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 e transportados para o laboratório para análises bioquímicas.

Este projeto faz parte do projeto de mestrado **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)**, do discente Gabriel Hiroshi o qual foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSCar) e aprovado, como já mencionado.

### ***3.3. Obtenção do homogeneizado***

Amostras de fígado foram homogeneizadas individualmente com um homogeneizador de tecidos Potter-Elvehjem Teflon IKA 10® em três volumes de tampão fosfato salina (PBS), contendo 1,365 M de NaCl, 0,027 M de KCl, 0,054 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) e 0,018M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 a 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g (HERMLE Z 323 K) durante 30 min a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para as determinações bioquímicas. Todas as análises bioquímicas foram em triplicatas e determinadas em leitor de microplacas - espectrofluorímetro - Dynex Technologies, Inc. Serial no. ACXC3191

### ***3.4. Método de análise***

As análises bioquímicas foram efetuadas individualmente em amostras dos tecidos após cada experimento e mantidas em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , após homogeneização e centrifugação de acordo com a análise indicada.

Todas as análises bioquímicas foram efetuadas no Laboratório de Biomarcadores (LaBioM) - Departamento de Biologia da UFSCar-Sorocaba. Os resultados são apresentados como valores médios  $\pm$  D.P.

#### **3.4.1. *Quantificação da Concentração de proteínas***

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976). O padrão protéico de albumina sérica bovina foi utilizado. O método baseia-se na interação entre o corante coomassie blue (BG-250) e proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz no comprimento de onda de 595 nm. O cálculo da concentração foi feito a partir da equação da reta ( $y = -0.1873x^2 + 0.7131x + 0.0012$ ) e foi expressa em mg/mL.

Por fim, foi realizado o cálculo de concentração e plotagem da equação da reta a partir dos valores de ABS obtidos. Não foi averiguado nenhuma amostra que precisou ser diluída novamente, pois seus valores de ABS verificados não excederam valor do ponto correspondente a 1,0 mg BSA/mL, assim, a curva-padrão não necessitou ser refeita (o que ocorreria caso o  $R^2 < 0,95$ ).

#### **3.4.2. *Quantificação da Concentração de Glicose***

A concentração de glicose foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 133, pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase de acordo com a orientação do fabricante com algumas modificações a 505 nm. O cálculo da concentração foi feito a partir da equação da reta ( $y = 0,1909x + 0,0011$ ) e a concentração de glicose foi expressa como mg/mL.

#### **3.4.3. *Quantificação da Concentração de Triglicerídeos***

A concentração de triglicérides foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 87, pelo método enzimático colorimétrico da glicerol-3-fosfato-oxidase de acordo com a orientação do fabricante com algumas modificações a 505 nm. O cálculo da concentração foi feito a partir da equação da reta ( $y = 0,0465x + 0,0007$ ) e a concentração de triglicerídeos foi expressa como mg/mL.

Para todas as análises, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras. O teste Kruskal-Wallis, para amostras não paramétricas, foi utilizado para as amostras de concentrações de proteína e glicose verificadas como assimétricas. Os testes Levene, para o teste de homogeneidade de amostras com distribuição normal, e Welch-ANOVA, para amostras paramétricas não homogêneas, foram utilizados para amostras de concentrações de triglicerídeos. Tais testes foram selecionados, pois as amostras estão relacionadas por envolverem o mesmo grupo de indivíduos em quatro tratamentos diferentes (Jamovi version 2.3, Computer Software).

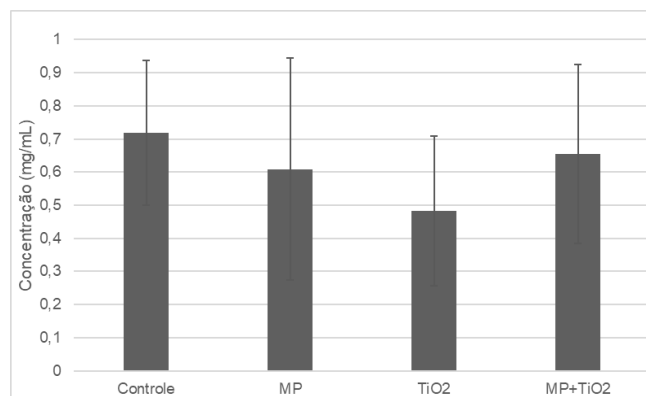
#### **4. Resultados e Discussão**

A compreensão da magnitude dos efeitos nocivos causados por contaminantes em diferentes organismos requer o desenvolvimento de mais estudos como este, que demonstrou a possibilidade de ocorrência de alguns dos efeitos tóxicos sobre os girinos, promovendo consequências negativas para seu desenvolvimento e sobrevivência. Esses contaminantes expostos na superfície da água e/ou em colunas de água provavelmente foram transferidos por meio das brânquias internas, uma vez que a bioacumulação de tais partículas pelos anfíbios ocorre principalmente por meio da pele (Bacchetta et al., 2012).

##### **4.1. Proteína**

Os resultados obtidos da concentração de proteínas totais no fígado dos girinos de *A. catesbeiana* não demonstraram diferença significativa entre os diferentes grupos comparados com o controle (Figura 1). Entretanto, é possível perceber uma tendência a aumento de concentração no grupo controle (0,719 mg/mL). Os grupos que apresentam tendência a concentrações um pouco inferiores a essa são do grupo exposto aos contaminantes conjugados MP+TiO<sub>2</sub> (0,654 mg/mL), seguido pelo grupo exposto ao MP (0,609 mg/mL). A tendência a menores concentrações foi observada no tratamento de indivíduos expostos ao TiO<sub>2</sub> (0,482 mg/mL), os quais constam no Apêndice A.

**Figura 1: Gráfico das concentrações de proteína (mg/mL) no fígado de *Aquarana catesbeiana*.**



(Fonte: elaborado pelo autor)

Legenda: Grupos expostos a diferentes tratamentos, sendo eles, controle, microplástico (MP), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e ambos os contaminantes conjugados (MP+TiO<sub>2</sub>)

Estudos anteriores (Araújo et al., 2020) avaliaram recentemente a toxicidade de MPs em girinos pertencentes à espécie *Physalaemus cuvieri* e encontraram um gradiente de tamanho de partículas de MPs diminuído nos órgãos desses modelos. Tal resultado sugeriu que as partículas maiores ficaram presas nas brânquias, enquanto que as de tamanho médio conseguiram passar pelo tubo gastrointestinal e cloaca sem serem absorvidas, e as menores foram absorvidas e acumuladas no fígado e nos tecidos musculares avaliados. Outro estudo encontrou microesferas de poliestireno de 0,5 mm acumuladas no hepatopâncreas, hemolinfa e ovários de caranguejos, bem como microesferas de poliestireno de 8-10 mm acumuladas principalmente em suas brânquias e intestino (Farrell; Nelson, 2013).

Segundo estudo conduzido por Chen et al. (2023), foram observados aumento dos espaços intercelulares do fígado e aumento do número de células pigmentares com tratamentos com indivíduos expostos ao microplástico. As pesquisas mostraram que essas partículas podem causar necrose degenerativa e inflamação no fígado de girinos de rã-touro americana, causando vacuolização das células hepáticas e o arranjo celular frouxo. Além disso, esse mesmo estudo constatou que, depois da exposição aos MPs, o fígado dos girinos de *P. cuvieri* foi danificado, apresentando vasodilatação, hipertrofia e hiperplasia, enquanto os núcleos celulares apresentaram maior área, circunferência, volume e maiores comprimentos dos eixos longo e curto. Portanto, as alterações na histopatologia hepática com os tratamentos microplásticos sugeriram redução da função hepática, explicando a diminuição do crescimento dos girinos e o atraso no desenvolvimento (Chen et al., 2023).

Estudos recentes que compararam anfíbios e peixes revelaram que exposições a MP e TiO<sub>2</sub> podem causar alterações bioquímicas no fígado, e não afetar diretamente a quantidade total de proteínas. Por exemplo, em girinos de *P. cuvieri*, expostos a microplásticos de polietileno desencadeou danos no fígado, contudo, a concentração proteica se manteve relativamente estável (Araújo et al., 2020). No que diz respeito ao TiO<sub>2</sub>, Ruvinda & Pathiratne (2021) relataram que nanomateriais de TiO<sub>2</sub> podem induzir alterações no fígado de girinos de *Duttaphrynus melanostictus*, mesmo sem mudança significativa na atividade de enzimas presentes no fígado, como acetilcolinesterase.

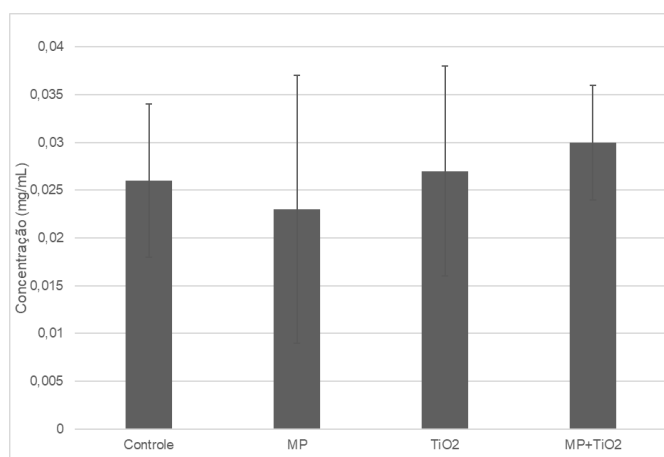
As proteínas correspondem ao nutriente de maior importância para os girinos, pois trata-se do principal constituinte do organismo animal em crescimento, cerca de 65% do peso do animal seco, bem como é essencial para formação de enzimas e hormônios (Pinto, 2014). Para que haja um desenvolvimento adequado dos girinos é necessário que haja quantidade adequada de proteína, razão pela qual a avaliação de tal nutriente configura-se também como um importante biomarcador para ecotoxicologia, e tais quantidades são influenciadas por fatores como concentração de energia na dieta, disponibilidade de aminoácidos, nível alimentar e condições ambientais (Pinto, 2014).

Dessa forma, percebe-se que tais resultados podem estar atrelados a variáveis como espécie, tempo de exposição, dose/concentração e forma de interação entre os contaminantes, entre outros. É preciso constatar que os resultados obtidos neste trabalho, ainda que destoantes dos resultados obtidos em outros estudos com enfoques histopatológicos, permitindo mensurar as alterações em outras análises, revelam dados importantes para pesquisas na área, uma vez que algumas variantes podem ter colaborado para obtenção desses resultados, como tempo de exposição elevado para detecção de mudanças metabólicas mais acentuadas que ocorrem nos primeiros dias de exposição. É possível ainda que os girinos tenham apresentado certa adaptabilidade aos desafios ambientais a que foram artificialmente submetidos, pois estudos anteriores evidenciaram que a evitação de acumulação de metais, por exemplo, é uma capacidade adaptativa de diversas espécies de anfíbios, devido à habilidade que eles possuem de suportar concentrações extremamente altas de metais, por exemplo, o que gera baixa acumulação de contaminantes em seus tecidos hepáticos (Falfushynska et al., 2015), e, conseqüentemente, pode contribuir para que não tenha se obtido diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de proteína (vide Apêndice A).

#### 4.2. Glicose

Os resultados das concentrações de glicose neste estudo não demonstraram diferença significativa entre os diferentes grupos comparados com o controle (Figura 2), tendo em vista os valores apresentados nas concentrações obtidas, dentre os quais a tendência ao maior valor foi observada no grupo de indivíduos expostos aos contaminantes conjugados MP+TiO<sub>2</sub> (0,030 mg/mL). Outro grupo que apresentou valores intermediários entre os demais foi o grupo de indivíduos expostos ao TiO<sub>2</sub> (0,027 mg/mL). Por fim, o grupo exposto ao MP apresentou tendência a menor concentração (0,023 mg/mL) em relação ao grupo controle (0,026 mg/mL), e todos estes valores constam no Apêndice B.

**Figura 2: Gráfico das concentrações de glicose (mg/mL) no fígado de *Aquarana catesbeiana*.**



(Fonte: elaborado pelo autor)

Legenda: Grupos expostos a diferentes tratamentos, sendo eles, controle, microplástico (MP), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e ambos os contaminantes conjugados (MP+TiO<sub>2</sub>)

Entretanto, apesar da obtenção de tais resultados, outros estudos revelaram que contaminantes como microplásticos e dióxido de titânio podem causar interferência no metabolismo energético de anfíbios. Com outra espécie de anfíbio, *Rana zhenhaiensis*, pesquisas conduzidas por Chen et al. (2023), mostraram que os microplásticos afetaram vias de metabolismo energético em girinos, bem como, esse mesmo estudo reitera os efeitos maléficos de tal poluente sobre peixes (*Danio rerio*), nos quais os MP estiveram associados a inibição das vias de glicólise-gliconeogênese e fosforilação oxidativa, gerando interrupção do metabolismo energético mitocondrial e, até mesmo, distúrbios comportamentais (Chen et al., 2023). De maneira semelhante, nanopartículas de dióxido de titânio mostraram-se associadas

à mortalidade e a alterações no fígado de girinos da espécie *Dendropsophus minutus* (Amaral et al., 2022).

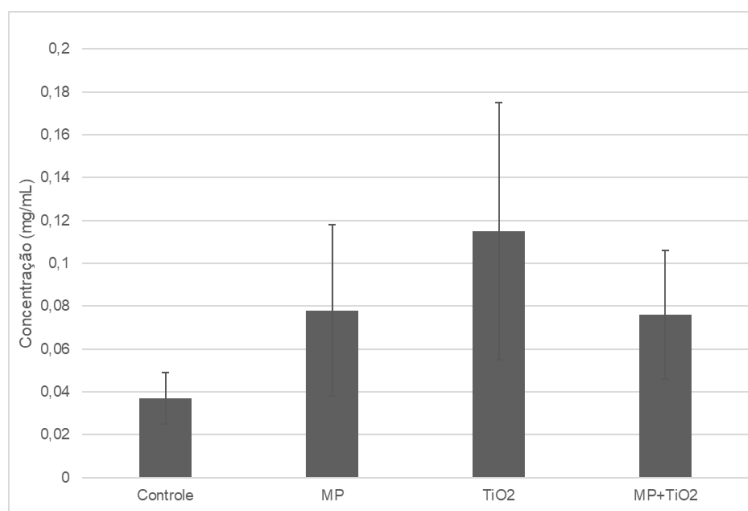
A glicose é considerada um dos principais nutrientes para formação de energia nos seres vivos, e, por isso, o seu metabolismo constitui-se como um mecanismo biológico fundamental para os vertebrados (Ishizuka et al., 2023). A glicose alimenta as vias das pentoses fosfato, as quais são precursoras de nucleotídeo e ácidos graxos, ambos fundamentais divisão celular e construção da membrana celular, respectivamente, por conseguinte, essenciais para o crescimento celular. Ademais, em tempos de inverno, por exemplo, o metabolismo da glicose é indispensável para sobrevivência dos anfíbios, pois tal componente é liberado em alta concentração no sangue a partir de glicogênio hepático, e, assim, atua como crioprotetor, reduzindo o ponto de congelamento dos fluidos corporais, protegendo as células do dano por formação de cristais de gelo (Mesa, 2023). Estudos com outras espécies mostraram que, no processo de regeneração de cauda de girinos (*Xenopus sp.*), a glicose é usada mais pela via das pentoses-fosfato, gerando fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e ribose-5-fosfato, que abastecem a síntese de lipídios e DNA necessários para proliferação e regeneração celular (Love et al., 2014).

Assim, neste estudo, a ausência de variação glicêmica pode estar relacionada a mecanismos dos próprios girinos para preservar estáveis níveis de glicose, como ocorre em outros vertebrados (Ishizuka et al., 2023). Porém, assim como no caso da concentração de proteínas, é possível que a concentração do MP, TiO<sub>2</sub>, bem como desses poluentes conjugados e/ou o tempo de exposição tenham sido insuficientes para detecção de alterações metabólicas mais aparentes. Por fim, devido a escassez de estudos na área não é possível afirmar que tais resultados devem a interação entre os contaminantes, contudo, como mostrado no gráfico, o grupo exposto aos poluentes conjugados apresentaram tendência a maior concentração de glicose comparados a exposições isoladas, todavia, mais pesquisas necessitam ser realizadas para obtenção de tais conclusões.

### 4.3. Triglicerídeos

Nos resultados obtidos neste trabalho, observa-se uma variação significativa nos níveis de triglicerídeos hepáticos (Figura 3), com diferenças estaticamente significativas. A tendência a menor concentração apresenta-se no grupo controle (0,037 mg/mL), seguido por tendência a concentrações intermediárias no grupo exposto ao MP (0,078 mg/mL) e no grupo exposto aos contaminantes conjugados (0,076 mg/mL), e a tendência a maior concentração no tratamento de indivíduos expostos ao TiO<sub>2</sub> (0,115 mg/mL), os quais constam no Apêndice C.

**Figura 3: Gráfico das concentrações de triglicerídeos (mg/mL) no fígado de *Aquarana catesbeiana***



(Fonte: elaborado pelo autor)

Legenda: Grupos expostos a diferentes tratamentos, sendo eles, controle, microplástico (MP), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e ambos os contaminantes conjugados (MP+TiO<sub>2</sub>)

Esses padrões sugerem alterações no metabolismo lipídico induzidas pelos tratamentos, pois exposições aos contaminantes podem causar estresse oxidativo e inflamação que levam ao acúmulo de triglicerídeos no fígado, fenômeno nomeado esteatose (Li et al., 2021; Ruvinda & Pathirate, 2021). Além disso, outro estudo mostrou que MP de poliestireno são responsáveis pelo aumento de vacúolos lipídicos no fígado e alterações nos genes do metabolismo energético e lipídico dos girinos (Chen et al., 2023).

O armazenamento de lipídios é essencial para o ciclo de vida de vertebrados como os anfíbios, visto que se trata de um dos nutrientes mais importantes para o ciclo de vida desses animais. Estudos anteriores já o identificavam assim, pois esses macronutrientes exercem diversas funções essenciais para o metabolismo desses seres vivos, uma vez que eles têm o potencial de servir como fonte de energia metabólica, bem como uma fonte de intermediários bioquímicos para o ciclo do ácido tricarboxílico. É um nutriente utilizado quando as reservas

de glicogênio estão esgotadas no organismo do girino. Trata-se de um importante componente da membrana celular que desempenha papel essencial durante as alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante a metamorfose dos anfíbios (Sawant; Varute, 1973; Zhu et al., 2024). Nesses animais, a maior parte dos lipídios são sintetizados e armazenados no fígado, o qual pode se tornar o seu depósito primário de gordura (Zhu et al., 2019). Sabe-se também que o crescimento e o desenvolvimento dos girinos são dependentes de quantidades adequadas de lipídios (Gao et al., 2024).

A menor concentração lipídica no grupo MP+TiO<sub>2</sub> em comparação às concentrações apresentadas nos grupos expostos aos poluentes isolados pode estar relacionada a uma possível agregação entre essas partículas que causam sua biodisponibilidade e toxicidade, como mostrado em estudo recente (Salla et al., 2023).

Destarte, os valores das concentrações de triglicerídeos apresentaram diferenças estatisticamente significativas (vide Apêndice C). Em geral, os contaminantes proporcionaram aumento da concentração lipídica no fígado dos girinos, o que pode comprometer diversas funções essenciais na regeneração, no crescimento e em processos metabólicos importantes, como na metamorfose, prejudicando seu desenvolvimento, e, conseqüentemente, sua sobrevivência.

## **5. Conclusão**

Em resumo, os resultados obtidos por meio dos experimentos realizados no presente estudo sugerem que a exposição de girinos a concentrações ambientalmente relevantes de microplásticos e nanopartículas de dióxido de titânio pode comprometer a homeostase metabólica após 21 dias de exposição, ainda que não tenham sido detectadas alterações significativas nas respostas de todos os biomarcadores, como proteína e glicose, contudo, estudos prévios têm sugerido conseqüências malélicas aos organismos. De forma geral, mesmo não sendo significativo, os resultados obtidos podem sugerir que o tempo de exposição podem ter sido suficientes para a recuperação do estresse oxidativo, o que pode ter levado a adaptação dos organismos às condições adversas às quais foram submetidos, impedindo uma detecção de variações significativas nas concentrações dos biomarcadores deste estudo.

Assim, os resultados obtidos nesta pesquisa, podem representar uma base inicial para a compreensão das vias de atuação e dos riscos toxicológicos dos microplásticos e nanopartículas, os quais poderão ser extrapolados e comparados posteriormente com outras

espécies, uma vez que resposta diferencial nos substratos pode demonstrar a necessidade de considerar os efeitos ecotoxicológicos complexos dos contaminantes e nutrientes nos ecossistemas. Assim, os resultados obtidos contribuem para confirmação, cada vez mais contundente, acerca do impacto maléfico desses poluentes na saúde de diversas populações, revelando a necessidade cada vez mais emergencial de mais estudos nessa área tão relevante atualmente.

## 6. Referências Bibliográficas

- AMARAL, D. F. do 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 International*, v. 29, p. 50515–50529, 2022.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. *Report of the AVMA panel on euthanasia*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 218, p. 669-696, 2020.
- ARAÚJO, A. P. da 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. da C.; MALAFAIA, G. *Microplastic ingestion induces behavioral disorders in mice: A preliminary study on the trophic transfer effects via tadpoles and fish*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 401, p. 123263, 2021.
- ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians*. *Annual Book of Standards*, v. 11.05, p. 220-240, 2000.
- BACCHETTA, R. et al. *Does carbon nanopowder threaten amphibian development?* *Carbon*, v. 50, p. 4607–4618, 2012.
- BETANCUR HENAO, C. P.; et al. *Nanoparticles for antibacterial materials and titanium dioxide applications*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 35, 2016.
- BOYERO, L. et al. *Microplastics impair amphibian survival, body condition and function*. *Chemosphere*, v. 244, 2020.
- 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, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. *Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009*. Presidência da República, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos, 2009.
- CHEN, W. et al. *Effects of microplastics on energy metabolism and physiological responses in Rana zhenhaiensis tadpoles*. *Toxics*, v. 13, p. 165, 2023.
- DE MORAES, C. A. 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.
- EUROPEAN COMMISSION. *Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial*. *Official Journal of the European Union*, 2011.

FALFUSHYNSKA, H. et al. *Hepatic metallothioneins in molecular responses to cobalt, zinc, and their nanoscale polymeric composites in frog Rana ridibunda. Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 171, p. 1–9, 2015.

FARRELL, P; NELSON, K. *Trophic level transfer of microplastic: Mytilus edulis (L.) to Carcinus maenas (L.). Environmental Pollution*, v. 177, p. 1–3, 2013.

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.

FERREZ, J. V. *Avaliação ecotoxicológica de metais potencialmente tóxicos das águas do rio Pirajibú por análises de biomarcadores bioquímicos no fígado de girinos de rãs-touro. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.*

FREIRE, M. M. et al. *Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. Oecologia Brasiliensis*, v. 12, p. 2, 2008.

GAO, J. et al. *Growth, feed utilization, lipid metabolism, and metamorphosis of bullfrog (Aquarana catesbeianus) tadpoles fed diets with different lipid levels. Aquaculture Nutrition*, v. 2024, p. 5513496, 2024.

ISHIZUKA, N. et al. *Na<sup>+</sup>-dependent intestinal glucose absorption mechanisms and its luminal Na<sup>+</sup> homeostasis across metamorphosis from tadpoles to frogs. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 324, p. R645–R655, 2023.

IUCN. *The IUCN Red List of Threatened Species: amphibians. 2023.*

JACINTHO, J. C. et al. *Genotoxicity, mutagenicity and immunotoxicity assessment of microplastics and nanoparticle mixture in bullfrog tadpoles. Environmental Research*, v. 283, p. 122105, 2025.

JEMEC, A. et al. *Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 147, p. 61–68, 2008.

JONES-COSTA, M. et al. *Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 151, 2018.

KHAN, J. et al. *Hepatotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. Journal of Applied Toxicology*, v. 45, p. 23–46, 2025.

LAJMANOVICH, R. C. et al. *Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. Science of The Total Environment*, v. 804, 2022.

LI, Y. et al. *Toxicity of polystyrene microplastics with cadmium on the digestive system of Rana zhenhaiensis tadpoles. International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2024.

LOVE, N. R. et al. *Carbohydrate metabolism during vertebrate appendage regeneration: what is its role? How is it regulated? BioEssays*, v. 36, p. 27–33, 2014.

MESA, N. *Infographic: How Tadpoles Use Glucose to Fuel Tail Regrowth. The Scientist*, 2023.

MONTAGNER, C. C. et al. *Microplásticos: ocorrência ambiental e desafios analíticos. Química Nova*, v. 44, p. 1328–1352, 2021.

NATIONS, S. et al. *Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on Xenopus laevis. Chemosphere*, v. 83, p. 1053–1061, 2011.

NOGUEIRA, F. L. A. et al. *Efeito do cádmio no fígado de girinos de rã-touro. Revista Eletrônica Científica da UERGS*, v. 3, p. 447–471, 2017.

OLIVATTO, G. P. et al. *Microplásticos: Contaminantes de preocupação global no Antropoceno. Revista Virtual de Química*, v. 10, p. 1968–1989, 2018.

OUELLET, M. et al. *Hindlimb deformities (Ectromelia, Ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. Journal of Wildlife Diseases*, p. 95–104, 1997.

PEREIRA, J. C. *Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões*. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, 2010.

PINTO, D. F. H. *Avaliação de níveis de proteína digestível para girinos de rã-touro*. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. 2014.

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, p. 848–854, 2021.

SALLA, R. F. et al. *Microplastics and TiO<sub>2</sub> nanoparticles mixture as an emerging threat to amphibians: a case study on bullfrog embryos (Aquarana catesbeiana). Environmental Pollution*, v. 346, p. 123624, 2023.

SANTANA, M. S. et al. *Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): systematic review and meta-analysis. Environmental Pollution*, v. 242, p. 449–461, 2018.

SAWANT, V. A.; VARUTE, A. T. Lipid changes in the tadpoles of *Rana tigrina* during growth and metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 44, p. 729–750, 1973.

SOUZA, A. M. et al. *Micro(nano)plastics as a vector of pharmaceuticals in aquatic ecosystem: Historical review and future trends. Journal of Hazardous Materials Advances*, v. 6, p. 100068, 2022.

SUN, X. et al. *Environmentally relevant concentrations of organic (benzophenone-3) and inorganic (titanium dioxide nanoparticles) UV filters co-exposure induced neurodevelopmental toxicity in zebrafish. Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 249, p. 114343, 2023.

THE JAMOVI PROJECT. *Jamovi (Versão 2.3) [programa de computador]*. 2022.

TRAN, T. et al. *Review on fate, transport, toxicity and health risk of nanoparticles in natural ecosystems: Emerging challenges in the modern age and solutions toward a sustainable environment. Science of The Total Environment*, v. 912, p. 169331, 2024.

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.

ZHU, B. et al. *Effects of thyroid powder on tadpole (Lithobates catesbeiana) metamorphosis and growth: The role of lipid metabolism and gut microbiota. Animals*, v. 14, p. 208, 2024.

## APÊNDICE A - TABELAS COM OS DADOS DE PROTEÍNA

**Tabela 1 - Concentrações de proteína (mg/mL) do fígado de *Aquarana catesbeiana*, expostos a diferentes grupos de tratamento, controle, microplástico (MP), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e ambos os contaminantes conjugados (MP+TiO<sub>2</sub>)**

	Controle	MP	NP	MP+NP
<b>Média</b>	0,719	0,609	0,482	0,654
<b>Desvio Padrão</b>	0,219	0,332	0,226	0,270
<b>N</b>	7	8	8	8

**Tabela 2 - Teste Shapiro-Wilk - Proteína**

	Controle	MP	NP	MP+NP
<b>p</b>	0,758	0,048	0,798	0,066

OBS: O valor de p ( $p < 0,05$ ), no grupo exposto ao MP, revelou que os valores das concentrações de proteína não são paramétricos.

**Tabela 3 - Teste Kruskal - Wallis (ANOVA a um fator - não paramétrico) - Proteína**

<b>X<sup>2</sup></b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
3,730	3	0,292

OBS: O valor de p ( $p > 0,05$ ) revela que não há diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

## APÊNDICE B - TABELA COM OS DADOS DE GLICOSE

**Tabela 1 - Concentrações de glicose (mg/mL) do fígado de *Aquarana catesbeiana*, expostos a diferentes grupos de tratamento, controle, microplástico (MP), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e ambos os contaminantes conjugados (MP+TiO<sub>2</sub>)**

	<b>Controle</b>	<b>MP</b>	<b>NP</b>	<b>Conjugado</b>
<b>Média</b>	0,026	0,023	0,027	0,030
<b>Desvio Padrão</b>	0,008	0,014	0,011	0,006
<b>N</b>	8	6	7	8

**Tabela 2 - Teste Shapiro-Wilk - Glicose**

	<b>Controle</b>	<b>MP</b>	<b>NP</b>	<b>MP+NP</b>
<b>p</b>	0,152	0,076	0,055	<0,001

OBS: O valor de p ( $p > 0,05$ ) no grupo exposto aos contaminantes conjugados revela que os valores das concentrações de glicose não são paramétricos.

**Tabela 3 - Teste Kruskal - Wallis (ANOVA a um fator - não paramétrico) - Glicose**

<b>X<sup>2</sup></b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
1,200	3	0,753

OBS: O valor de p ( $p > 0,05$ ) revela que não há diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

## APÊNDICE C - TABELA COM DADOS DE TRIGLICERÍDEOS

**Tabela 1 - Concentrações de triglicerídeos (mg/mL) do fígado de *Aquarana catesbeiana*, expostos a diferentes grupos de tratamento, controle, microplástico (MP), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e ambos os contaminantes conjugados (MP+TiO<sub>2</sub>)**

	<b>Controle</b>	<b>MP</b>	<b>NP</b>	<b>Conjugado</b>
<b>Média</b>	0,037	0,078	0,115	0,076
<b>Desvio Padrão</b>	0,012	0,040	0,060	0,030
<b>N</b>	6	7	7	8

**Tabela 2 - Teste Shapiro-Wilk - Triglicerídeos**

	<b>Controle</b>	<b>MP</b>	<b>NP</b>	<b>MP+NP</b>
<b>p</b>	0,115	0,100	0,078	0,219

OBS: Com os valores de p ( $p > 0,05$ ), as amostras foram consideradas paramétricas.

**Tabela 3 - Teste à homogeneidade das variâncias (Levene) - Triglicerídeos**

<b>F</b>	<b>gl 1</b>	<b>gl 2</b>	<b>p</b>
5,505	3	24	0,005

OBS: Com o valor de p ( $p < 0,05$ ), as amostras foram consideradas não homogêneas.

**Tabela 4 - Teste Welch-ANOVA**

<b>F</b>	<b>gl 1</b>	<b>gl2</b>	<b>p</b>
7,137	3	12,068	0,005

OBS: Os valores das concentrações de triglicerídeos revelaram que há diferença significativa entre os grupos.