

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CBBS)  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (DCF)**

**YAN COSTA GONÇALVES**

**EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE NONILFENOL  
ETOXILADO (NPE) EM MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM  
GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*) SOB O  
CENÁRIO DO AQUECIMENTO GLOBAL**

**SÃO CARLOS -SP  
2025**

YAN COSTA GONÇALVES

**EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE NONILFENOL ETOXILADO (NPE) EM  
MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*)  
SOB O CENÁRIO DO AQUECIMENTO GLOBAL**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF UFSCar/UNESP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro

São Carlos-SP  
2025



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Yan Costa Gonçalves, realizada em 14/03/2025.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro (UFSCar)

Profa. Dra. Helen Sadauskas Henrique (UNISANTA)

Profa. Dra. Talita Laurie Lustosa do Carmo (LORAS)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha mãe, Magda dos Santos Costa.

Que esta conquista seja um lembrete: nenhum lugar está distante para quem carrega consigo a  
força de sua origem.

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desse período, entendi que mesmo cercado de pessoas incríveis que mudam os meus piores dias e estão sempre dispostas a ajudar, se eu não estiver bem comigo mesmo, nada flui. Portanto, agradeço a mim por toda a resiliência e esforço durante esse processo de formação acadêmica, que está longe de ser fácil, mas que quando olha para trás, o único sentimento que resta é o orgulho. O orgulho de não ter desistido e enfrentado todos os meus piores dias de cabeça erguida e com foco nos meus objetivos.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Profa. Diana, por todo o aprendizado que venho adquirindo como seu aluno desde 2019. Tenho certeza de que eu não conseguiria chegar até esse momento da minha trajetória acadêmica com todo esse conhecimento científico e crescimento pessoal, sem a sua colaboração. Obrigado por todas as oportunidades e conversas, tenho orgulho de ser seu aluno.

Minha família, sem vocês eu também não chegaria até aqui. Muito obrigado a todos, em especial a minha mãe Magda e a minha irmã Duda, sou imensamente grato por ter essas preciosidades em minha vida, amo vocês. Em especial gostaria de agradecer a minha Madrinha, tia Magali, por todo incentivo, apoio e amor, assim como as minhas avós, vó Zefa e vó Margarete, que sempre demonstraram seu amor, cuidado e orgulho por eu estar alcançando meus objetivos. Agora vocês terão um neto mestre!

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos que de alguma forma, me ajudaram a encarar a vida com mais alegria e prazer. Em especial a Natalia, Andressa, Hugo, Raquel e Tamires, muito obrigado, amo vocês! Não poderia faltar os agradecimentos ao meu namorado, Lucas, obrigado por toda ajuda, carinho e amor que você oferece todos os dias a mim, te amo! Também gostaria de agradecer a todos meus colegas de laboratório, aos que já passaram pelo LZBC e aos que permanecem, pela ajuda na realização desse trabalho. Em especial, agradeço a Suzana, minha grande amiga e parceira de todos os dias que definitivamente, fez esse ser um caminho mais prazeroso com toda sua alegria!

Por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Proc. 88887.823179/2023-00) pela minha bolsa de mestrado, ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 301809/2022-4) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

“O homem, que deixou de ser escravo da Natureza tampouco é o senhor que nela impera, deveria ser o seu vigilante guardião.”

Benedito Nunes.

# EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE NONILFENOL ETOXILADO (NPE) EM MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*) SOB O CENÁRIO DO AQUECIMENTO GLOBAL

YAN COSTA GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

O declínio global das populações de anfíbios tem sido amplamente documentado, sendo atribuído a uma complexa interação de fatores ambientais. Entre esses, destaca-se a poluição química por contaminantes emergentes, como o nonilfenol etoxilado (NPE), associada ao aumento da temperatura das águas superficiais decorrente das mudanças climáticas. Esses fatores, atuando de forma sinérgica, podem potencializar o declínio significativo das espécies de anfíbios. O NPE, um surfactante amplamente utilizado na formulação de produtos sanitários, higiênicos e agroquímicos, tem sido frequentemente detectado em ecossistemas aquáticos brasileiros em concentrações alarmantes e acima das regulamentações internacionais. Apesar de sua relevância ambiental, há uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos subletais do NPE em anfíbios, especialmente sob condições de estresse térmico. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos subletais da exposição aguda (48 h) a uma concentração ambientalmente relevante de NPE ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em girinos de *Aquarana catesbeiana*, no estágio 25 de Gosner, sob duas condições térmicas distintas ( $25^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ ), bem como avaliar a interação entre esses fatores (NPE x temperatura). Foram analisados múltiplos biomarcadores: índices biométricos (fator de condição de Fulton [K], índice hepatossomático [IHS] e massa ventricular relativa [MVR]), biomarcadores fisiológicos (frequência cardíaca [ $f_H$ ], força de contração ventricular [Fc], capacidade de bombeamento cardíaco [CBC], taxa de contração [ $+dF/dt$ ] e taxa de relaxamento [ $-dF/dt$ ]), biomarcadores bioquímicos (atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase [SOD], catalase [CAT], glutathione S-transferase [GST] e glutathione peroxidase [GPx]; conteúdo de glutathione reduzida [GSH]; níveis de lipoperoxidação [LPO] e proteína carbonilada [PC] nos tecidos hepático, branquial e muscular), e biomarcadores neurotóxicos (atividade da acetilcolinesterase [AChE] no encéfalo e músculo). A exposição ao NPE promoveu efeitos hepatotóxicos (redução do IHS e das defesas antioxidantes), cardiotoxicos (reduções da MVR, Fc,  $+dF/dt$  e  $-dF/dt$ ), taquicardia, alterações no sistema de defesa antioxidante e indução de estresse oxidativo nas brânquias e no músculo, além da inibição da AChE muscular. O aumento da temperatura intensificou o efeito inotrópico negativo, depletou as defesas antioxidantes branquiais e acentuou o estresse oxidativo no fígado e no músculo, além de causar neurotoxicidade central. Esses resultados indicam que, em ambientes contaminados por NPE, o aumento da temperatura associado às mudanças climáticas, pode agravar os efeitos subletais do NPE, mesmo após a exposição a curto prazo. A ausência de regulamentações para concentrações seguras de NPE na legislação brasileira, somada ao aquecimento global, representa uma ameaça crítica à biodiversidade, especialmente para anfíbios, destacando a necessidade urgente de diretrizes ambientais e estratégias de mitigação.

**Palavras-chave:** Anfíbios. Contaminante emergente. Mudanças climáticas. Função cardíaca. Estresse oxidativo. Hepatotoxicidade. Neurotoxicidade.

# EFFECTS OF THE EMERGING CONTAMINANT NONYLPHENOL ETHOXYLATE (NPE) ON MULTIPLE BIOMARKERS IN BULLFROG TADPOLES (*Aquarana catesbeiana*) UNDER THE SCENARIO OF GLOBAL WARMING

YAN COSTA GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiological Sciences (DCF), Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos Campus, Washington Luís Highway, Km 235, ZIP Code 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.

The global decline in amphibian populations has been extensively documented and is attributed to a complex interplay of environmental factors. Among these, chemical pollution from emerging contaminants, such as nonylphenol ethoxylate (NPE), combined with the increase in surface water temperatures due to climate change, stands out. These factors, acting synergistically, may exacerbate the significant decline in amphibian species. NPE, a surfactant widely used in the formulation of sanitary, hygienic and agrochemical products, has frequently been detected in Brazilian aquatic ecosystems at alarming concentrations, exceeding international regulations. Despite its environmental relevance, there is a gap in knowledge regarding the sublethal effects of NPE on amphibians, particularly under thermal stress conditions. This study aimed to investigate the sublethal effects of acute exposure (48 h) to an environmentally relevant concentration of NPE ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) on *Aquarana catesbeiana* tadpoles at Gosner stage 25, under two distinct thermal conditions ( $25^{\circ}\text{C}$  and  $30^{\circ}\text{C}$ ), as well as to evaluate the interaction between these factors (NPE  $\times$  temperature). Multiple biomarkers were analyzed: biometric indices (Fulton's condition factor [K], hepatosomatic index [HSI], and relative ventricular mass [RVM]), physiological biomarkers (heart rate [ $f_H$ ], ventricular contraction force [Fc], cardiac pumping capacity [CPC], contraction rate [ $+dF/dt$ ], and relaxation rate [ $-dF/dt$ ]), biochemical biomarkers (activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase [SOD], catalase [CAT], glutathione S-transferase [GST], and glutathione peroxidase [GPx]; reduced glutathione content [GSH]; levels of lipid peroxidation [LPO] and protein carbonylation [PC] in hepatic, branchial, and muscular tissues), and neurotoxic biomarkers (acetylcholinesterase [AChE] activity in the brain and muscle). Exposure to NPE induced hepatotoxic effects (reduction in HSI and antioxidant defenses), cardiotoxic effects (reductions in RVM, Fc,  $+dF/dt$ , and  $-dF/dt$ ), tachycardia, alterations in the antioxidant defense system, and oxidative stress in the gills and muscle, as well as inhibition of muscular AChE. The increase in temperature intensified the negative inotropic effect, depleted branchial antioxidant defenses, and exacerbated oxidative stress in the liver and muscle, in addition to causing central neurotoxicity. These results indicate that in environments contaminated with NPE, rising temperatures associated with climate change may aggravate the sublethal effects of NPE, even after short-term exposure. The absence of regulations for safe NPE concentrations in Brazilian legislation, coupled with global warming, represents a critical threat to biodiversity, particularly for amphibians, highlighting the urgent need for environmental guidelines and mitigation strategies.

**Keywords:** Amphibians. Emerging contaminant. Climate changes. Cardiac function. Oxidative stress. Hepatotoxicity. Neurotoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Esquema ilustrativo das algumas das principais causas do declínio global das populações de anfíbios. 16
- Figura 2** – Moléculas do NPE, NP e 17 $\beta$ -estradiol. 21
- Figura 3** – Representação de como as vias (hospitolar, industrial e doméstica) de despejos do NPE pode atingir as populações de anfíbios. 23
- Figura 4** – Representação dos impactos do aquecimento das águas superficiais sobre a riqueza de espécies e a seleção de espécies resistentes a altas temperaturas. 24
- Figura 5** – Exemplos de *Aquarana catesbeiana* no estágio de Gosner 25 empregados no estudo. 29
- Figura 6** – Girinos de *A. catesbeiana* do grupo controle (a esquerda) e expostos a 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE (a direita) mantidos a 30 °C em sistema estático. 30
- Figura 7** – *Set up* para análises de contratilidade ventricular *ex vivo*. 33
- Figura 8** – Fator de condição de Fulton (K) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. 37
- Figura 9** – Índice hepatossomático (IHS) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. 38
- Figura 10** – Massa ventricular relativa (MVR) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. 39
- Figura 11** – Frequência cardíaca *in loco* ( $f_H$ ) em batimentos por minuto (BPM) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. 40
- Figura 12** – (A) Força isométrica ( $F_c$ ), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *A. catesbeiana* mantidos a 25°C, no grupo controle (Ct25, n=12) e no grupo exposto (NPE25, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 1,8 Hz). 42
- Figura 13** – (A) Força isométrica ( $F_c$ ), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *A. catesbeiana* mantidos a 30°C no grupo controle (Ct30, 44

n=12) e no grupo exposto (NPE30, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 2,0 Hz).

**Figura 14** – (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos controles mantidos a 25°C e 30°C (Ct25, n=12; Ct30, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 2,0 Hz). 45

**Figura 15** – (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos expostos mantidos a 25°C e 30°C (NPE25, n=12; NPE30, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 2,0 Hz). 47

**Figura 16** – Atividade das enzimas (A) SOD, (B) CAT, (C) GST, (D) GPx e conteúdo de (E) GSH no fígado de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). 50

**Figura 17** – Nível de (A) LPO e (B) PC no fígado de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). 51

**Figura 18** – Atividade das enzimas (A) SOD, (B) CAT, (C) GST, (D) GPx e conteúdo de (E) GSH das brânquias de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). 53

**Figura 19** – Nível de (A) LPO e (B) PC nas brânquias de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). 54

**Figura 20** – Atividade das enzimas (A) SOD, (B) CAT, (C) GST, (D) GPx e conteúdo de (E) GSH do músculo de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). 56

**Figura 21** – Nível de (A) LPO e (B) PC no músculo de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). 57

**Figura 22** – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no (A) cérebro e (B) músculo de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. 60

**Figura 23** – Representação esquemática da relação entre a  $[Ca^{2+}]$  transiente e a geração da Fc. 67

**Figura 24** – Representação esquemática do AE-C em cardiomiócitos (A) de mamíferos 69

e (B) vertebrados basais.

**Figura 25** – Esquema do sistema antioxidante; principais EROs e compostos reativos (em vermelho), vias antioxidantes enzimáticas (verde e azul), conteúdos antioxidantes não enzimáticos (marrom). **75**

**Figura 26** – Efeitos da exposição ao NPE nas duas temperaturas (25°C e 30°C) sobre os sistemas antioxidantes e a indução do estresse oxidativo no fígado dos girinos. **78**

**Figura 27** – Efeitos da exposição ao NPE nas duas temperaturas (25°C e 30°C) sobre os sistemas antioxidantes e a indução do estresse oxidativo nas brânquias dos girinos. **81**

**Figura 28** – Efeitos da exposição ao NPE nas duas temperaturas (25°C e 30°C) sobre os sistemas antioxidantes e a indução do estresse oxidativo no músculo dos girinos. **85**

**Figura 29** – Esquemas representando a localização da AChE na fenda sináptica no SNC e na junção neuromuscular. **92**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* para os parâmetros K, IHS e MVR obtidos de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). **39**
- Tabela 2** – Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* nos parâmetros de contratilidade ventricular Fc, CBC e taxas de contração (+ dF/dt) e relaxamento (- dF/dt) de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). **48**
- Tabela 3** – Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* nos biomarcadores bioquímicos do fígado, brânquia e músculo de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). **58**
- Tabela 4** – Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* na atividade da AChE ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) no encéfalo e músculo de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). **60**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AE-C – Acoplamento excitação-contração

BPA – Bisfenol A

CAT – Catalase

CBC – Capacidade de bombeamento cardíaco

CE – Contaminante emergente

$f_H$  – Frequência cardíaca

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GST – Glutathione S-transferase

IHS – Índice hepatossomático

LPO – Lipoperoxidação

MVR – Massa ventricular relativa

NCX – Trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

NP – Nonilfenol

NPE – Nonilfenol etoxilado

PC – Proteína carbonilada

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

## **LISTA DE SIGLAS**

AVMA – American Veterinary Medical Association

ASTM – American Society for Testing and Materials

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

US EPA – United States Environmental Protection Agency

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>16</b>
1.1 <i>Anfíbios como bioindicadores</i>	16
1.2 <i>Nonilfenol etoxilado</i>	20
1.3 <i>Mudanças climáticas</i>	23
1.4 <i>Justificativa</i>	26
1.5 <i>Hipótese</i>	27
1.6 <i>Objetivo geral</i>	27
1.6.1 <i>Objetivos específicos</i>	27
<b>2. Materiais e métodos</b>	<b>29</b>
2.1 <i>Animais</i>	29
2.2 <i>Delineamento experimental</i>	29
2.3 <i>Quantificação de NPE na água</i>	31
2.4 <i>Índices biométricos</i>	31
2.5 <i>Biomarcadores fisiológicos</i>	32
2.6 <i>Biomarcadores bioquímicos</i>	33
2.7 <i>Biomarcadores neurotóxicos</i>	35
2.8 <i>Análise estatística dos dados</i>	36
<b>3. Resultados</b>	<b>37</b>
3.4 <i>Alterações comportamentais durante a exposição e níveis de NPE na água</i>	37
3.5 <i>Índices biométricos</i>	37
3.5.1 <i>Fator de condição de Fulton (K)</i>	37
3.5.2 <i>Índice hepatossomático (IHS)</i>	37
3.5.3 <i>Massa ventricular relativa (MVR)</i>	38
3.6 <i>Biomarcadores fisiológicos</i>	39
3.6.1 <i>Frequência cardíaca in loco (f<sub>H</sub>)</i>	39
3.6.2 <i>Parâmetros de contratilidade ventricular</i>	40
3.7 <i>Biomarcadores bioquímicos</i>	49
3.8 <i>Biomarcadores neurotóxico</i>	59
<b>4. Discussão</b>	<b>61</b>
4.1 <i>Alterações biométricas</i>	61
4.2 <i>Cardiotoxicidade</i>	65
4.3 <i>Sistema antioxidantes e estresse oxidativo</i>	74
4.4 <i>Neurotoxicidade</i>	91
<b>5. Conclusão</b>	<b>95</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>96</b>



O Brasil é reconhecido como um *hotspot* global de biodiversidade de anfíbios, abrigando em torno de 1.100 espécies, muitas das quais são endêmicas, ou seja, são encontradas somente nesse território (VASCONCELOS et al., 2014; SEGALLA et al., 2021). Essa riqueza é resultado da grande diversidade de ecossistemas do país, oferecendo habitats únicos para a reprodução e sobrevivência desses animais. Dentro dos ecossistemas brasileiros, os anfíbios desempenham papéis ecológicos essenciais, como o controle de populações de invertebrados, além de contribuírem para a dinâmica de teias ecológicas complexas (SILVANO; SEGALLA, 2004; BRASILEIRO et al., 2005; STRÜSSMANN et al., 2010). A elevada sensibilidade dos anfíbios a mudanças ambientais faz com que eles sejam considerados ótimos bioindicadores da saúde dos ecossistemas, tornando essencial a implementação de medidas de conservação (SENEVIRATNE et al., 2015; SABER et al., 2017). A conservação dessas espécies é fundamental não apenas para a manutenção do equilíbrio ecológico, mas também para garantir a resiliência dos ecossistemas aquáticos e terrestres nos quais estão inseridos.

O comprometimento na qualidade da água resultante de atividades antrópicas tem um impacto significativo nos ecossistemas aquáticos e na disponibilidade desse recurso para diversos organismos. O lançamento de efluentes industriais e domésticos sem tratamento adequado introduz poluentes químicos, metais, contaminantes emergentes e nutrientes em excesso, favorecendo processos como a contaminação por substâncias tóxicas (LIER; LETTINGA, 1999; KANU; ACHI, 2011;). Além disso, o uso intensivo de pesticidas e fertilizantes na agricultura contribui para a lixiviação de compostos nocivos para os corpos d'água.

Estudos na literatura demonstram como inseticidas e herbicidas (RELYEA, 2005; LAJMANOVICH et al., 2015), misturas de pesticidas (HAYES et al., 2006), interações entre estressores químicos e físicos (BLAUSTEIN et al., 2003) podem alterar o desenvolvimento larval de anfíbios. Esses efeitos incluem atraso no processo de metamorfose, anomalias morfológicas, alterações comportamentais, comprometimento da maturação sexual, redução do crescimento, maior vulnerabilidade a patógenos e aumento da taxa de mortalidade. De modo geral, alguns órgãos apresentam maior sensibilidade a estressores ambientais devido à maior exposição ou à relevância de suas respostas fisiológicas à contaminação.

O tecido branquial desempenha um papel fundamental na respiração e na regulação osmótica dos girinos, caracterizando-se por sua elevada vascularização e extensa superfície de exposição, o que o torna diretamente suscetível à interação com poluentes presentes no ambiente aquático (BERNABÓ et al., 2008; BRUNELLI et al., 2010). A exposição a contaminantes pode induzir danos histopatológicos significativos, prejudicando as trocas

gasosas e a tomada de oxigênio (O<sub>2</sub>) e comprometendo a capacidade osmorregulatória (CARRERA et al., 2007; ELIZALDE-VELÁZQUEZ et al., 2023; SANTOS et al., 2024).

O tecido hepático, por sua vez, desempenha um papel central no metabolismo e na desintoxicação de xenobióticos. Responsável pela biotransformação e neutralização de toxinas (APTE; KRISHNAMURTHY, 2011), o fígado pode sofrer danos significativos frente a exposição a poluentes, incluindo necrose, processos inflamatórios e alterações na atividade enzimática (BERNABÓ et al., 2014). A análise da condição hepática é crucial para a identificação de efeitos subletais da contaminação, que podem comprometer tanto o metabolismo energético (SALLA et al., 2020) quanto a capacidade biotransformação de xenobióticos.

O sistema muscular é essencial para a locomoção, captura de alimentos e sobrevivência dos girinos, também é vulnerável aos efeitos da contaminação química (CARVALHO et al., 2017). Alterações na função muscular de girinos induzidas por poluentes podem ocorrer por meio da indução de estresse oxidativo (FERNANDES et al., 2021). Esse evento é favorecido pela maior suscetibilidade do tecido muscular à entrada de contaminantes, uma vez que o aumento do fluxo sanguíneo durante a metamorfose eleva a exposição do tecido a agentes tóxicos. Além disso, a elevada taxa metabólica característica desse estágio de desenvolvimento contribui para a maior acumulação de poluentes que comprometem a função muscular (CARVALHO et al., 2017). Tais implicações podem resultar na redução da atividade natatória e do escape de predadores, diminuindo a aptidão dos girinos.

A avaliação das respostas cardíacas à exposição a poluentes é de extrema relevância, uma vez que o coração é responsável pela circulação sanguínea e pela perfusão adequada de O<sub>2</sub> e nutrientes aos tecidos. Contaminantes como metais, pesticidas e compostos orgânicos podem interferir na função cardíaca, causando alterações na frequência cardíaca (COSTA et al., 2014), redução da força de contração do miocárdio ventricular (COSTA et al., 2008) e alterações morfológicas, como a hipertrofia (aumento da massa ventricular) (SALLA et al., 2015) ou a degeneração do miocárdio (redução da massa ventricular) (GONÇALVES et al., 2025). As alterações na massa do miocárdio ventricular atuam como um mecanismo de ajuste fisiológico em animais ectotérmicos, permitindo que esses organismos lidem com os estressores ambientais, sendo essencial para preservar a função cardíaca em condições ambientais adversas (CALORE et al., 2007; KEEN, 2017).

O sistema nervoso desempenha um papel essencial na captação, processamento e geração de respostas aos estímulos ambientais. As respostas do sistema nervoso à contaminação são de extrema relevância, uma vez que o sistema nervoso central (SNC) e

periférico (SNP) são diretamente afetados, prejudicando funções vitais como locomoção, alimentação e resposta a predadores (OSSANA; CASTAÑÉ; SALIBIÁN, 2013; CARVALHO et al., 2020). Compostos como organofosforados e disruptores endócrinos podem inibir enzimas essenciais para a transmissão sináptica resultando em descoordenação motora, paralisia e alterações comportamentais significativas em vertebrados (TALORETE et al., 2001; ARONZON et al., 2016).

A avaliação integrada desses órgãos, por meio de uma abordagem que utiliza múltiplos biomarcadores, é fundamental para compreender os efeitos subletais da contaminação ambiental sobre a fisiologia de diferentes sistemas de girinos. Essa abordagem permite a identificação de alterações subletais antes que efeitos letais se manifestem. Dessa forma, o monitoramento desses biomarcadores é essencial para a implementação de estratégias de gestão ambiental e para a proteção da saúde dos ecossistemas aquáticos. Com base nesses dados, é possível avaliar e prever com maior precisão as consequências ambientais, proporcionando uma compreensão mais abrangente e robusta dos impactos de um determinado xenobiótico (GALLOWAY et al., 2004).

A rã-touro (*Aquarana catesbeiana*, SHAW 1802) é uma espécie amplamente estudada e conhecida. Originária da América do Norte, essa espécie foi introduzida no Brasil para fins comerciais (CUNHA; DELARIVA, 2009). Entretanto, o manejo inadequado por parte dos produtores resultou na fuga de exemplares dos criadouros, o que facilitou a invasão da espécie e seu estabelecimento em ambientes tropicais. Devido à sua alta capacidade adaptativa e a ausência de predadores naturais, a rã-touro expandiu-se por vastas áreas do território brasileiro, tornando-se uma espécie exótica invasora (FICETOLA et al., 2007; LEVER, 2023). Essa característica, aliada à sua elevada homogeneidade genética (JORGEWICH-COHEN et al., 2022), faz com que as respostas de diversos biomarcadores a xenobióticos sejam consistentes entre os indivíduos, conferindo maior reprodutibilidade aos estudos experimentais.

Apesar da rã-touro ser considerada uma espécie relativamente resistente a poluentes, ela representa um modelo experimental valioso por algumas razões. Em primeiro lugar, os dados obtidos com girinos de *A. catesbeiana* podem ser extrapolados para prever os impactos de estressores em espécies de anfíbios mais sensíveis, que muitas vezes são mais difíceis de estudar diretamente devido à sua menor tolerância a poluição ou à escassez de indivíduos nos ambientes naturais. Além disso, a utilização de uma espécie exótica e invasora como a rã-touro está alinhada com o princípio dos 3R's (*Replacement, Reduction and Refinement*) no uso de animais em pesquisas, especificamente o conceito de substituição. Ao utilizar uma espécie que já está amplamente disseminada e que compete com espécies nativas, reduz-se a necessidade

de coletar ou criar espécies nativas para fins experimentais, minimizando assim o impacto sobre populações selvagens, muitas das quais estão ameaçadas de extinção. Devido a maior vulnerabilidade das larvas aos estressores, utilizar girinos de rã-touro se torna essencial, principalmente em estágios pré-metamórficos, como o estágio 25 de Gosner, onde a larva possui todos os órgãos desenvolvidos e direcionam suas reservas energéticas e processos fisiológicos para a metamorfose, um período crítico para o sucesso na fase adulta. A maioria dos estudos ecotoxicológicos com anfíbios anuros é realizada após as brânquias das larvas se tornarem internalizadas, nos estágios de Gosner 25 a 32 (DEVILLERS; EXBRAVAT, 1992). Portanto, a rã-touro não apenas oferece um modelo robusto e confiável para estudos ecotoxicológicos, mas também permite a aplicação de práticas éticas na pesquisa, contribuindo para a conservação de espécies nativas.

### ***1.2 Nonilfenol etoxilado (NPE)***

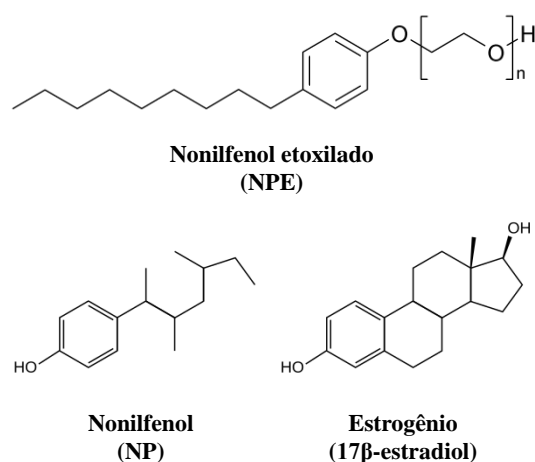
Membro do grupo dos alquilfenóis, o nonilfenol etoxilado (NPE) é um composto pertencente à classe dos surfactantes não iônicos, amplamente utilizado em processos industriais. Devido às suas características anfifílicas, o NPE é utilizado na formulação de diversos produtos de limpeza de uso geral (detergentes, sabonetes, desinfetantes e desengordurantes, por exemplo), emulsificantes em tintas látex, umectantes, solubilizantes utilizados em pesticidas, agentes de flotação, produtos de limpeza nas indústrias de metalurgia, têxtil e alimentar, além de limpadores de uso doméstico (THIELE et al., 1997; YING, 2002; SOARES, 2008). É frequentemente utilizado em soluções aquosas, com aproximadamente 60% sendo descarregados no ambiente aquático (SOLÉ et al., 2000).

O NPE é produzido a partir do nonilfenol (NP) proveniente do refino de petróleo e classificado como uma substância química de alto volume de produção, com uma produção anual estimada em 1.700.000 toneladas nos Estados Unidos e até 100.000 toneladas na União Europeia (DE LA PARRA-GUERRA; ACEVEDO-BARRIOS 2023). No Brasil, não há dados sobre a produção anual de NPE. A estrutura química do NPE contém cadeias de óxido de etileno adicionadas a hidroxila da molécula do NP, conferindo propriedades emulsificantes e solubilizantes (ATTA et al., 2014). Essas características tornam o NPE um agente eficaz para reduzir a tensão superficial de líquidos, facilitando a solubilização de substâncias insolúveis em água.

O NPE é classificado como um contaminante emergente (CE). Os CEs incluem uma ampla variedade de compostos, como fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios

exógenos e pesticidas, que não são comumente removidos e eliminados após o tratamento das águas. Adicionalmente, os CEs não são monitorados e regulamentados pelas legislações ambientais (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014; TAHERAN et al., 2018). Eles são frequentemente liberados no ambiente por meio de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, e, devido à sua persistência e capacidade de bioacumulação, podem causar impactos negativos mesmo em baixas concentrações (KAN et al., 2022). A preocupação com esses contaminantes aumenta à medida que estudos revelam seus efeitos como agentes tóxicos para diferentes espécies, destacando a necessidade de maior atenção e regulamentação.

**Figura 2.** Moléculas do NPE, NP e 17β-estradiol.



**Fonte:** imagens de acesso livre.

Estudos investigando os efeitos do NPE são essenciais, pois sua degradação no meio ambiente (via biodegradação ou fotodegradação) (EKELUND et al., 1993; AHEL et al., 1994), gera subprodutos com alta persistência e toxicidade, sendo detectado em diversas matrizes ambientais. Um dos principais produtos dessa degradação é o próprio NP, um clássico disruptor endócrino como os outros alquilfenóis, já bem documentado na literatura sua ação sobre a via estrogênica desde organismos aquáticos até mamíferos terrestres (GONG; HAN, 2006; WARING; HARRIS, 2007; SOARES et al., 2008; JIN et al., 2010; CAPALDO et al., 2012; PARRA-GUERRA et al., 2020; BHANDARI et al., 2021; ZHAO et al., 2024)

O NP ganhou notoriedade como um potencial xenoestrógeno após trabalhos como o de Soto et al. (1991), que verificaram um alquilfenol empregado na produção dos tubos de ensaio estava induzindo a mitose de células tumorais de mama MCF-7, o que mais tarde foi relacionado à sua atividade estrogênica por similaridade estrutural e funcional com o 17β-estradiol (SOARES, 2008). Bevan et al. (2003) demonstraram que, em girinos de *Xenopus*

*laevis*, o NPE é mais tóxico e com efeitos potencializados sob o desenvolvimento dos animais, do que pelo 17 $\beta$ -estradiol exógeno em concentrações equivalentes.

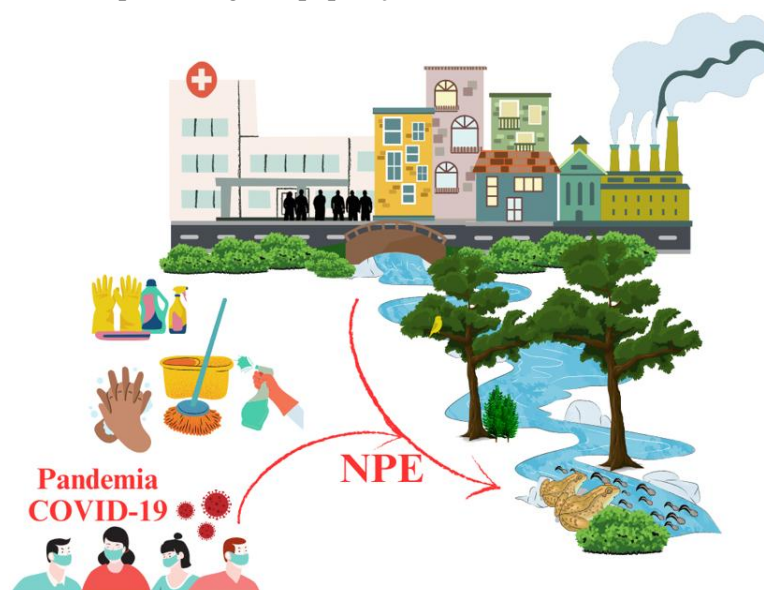
Estima-se que aproximadamente 60% do NP e derivados produzidos globalmente sejam descartados em sistemas de abastecimento de água (HONG et al., 2020; BHANDARI et al., 2021). Devido às preocupações relacionadas ao uso de NP e etoxilados, alguns países estabeleceram regulamentações para definir os valores máximos permitidos desses contaminantes em corpos d'água superficiais. Na União Europeia (2008), a Diretiva 2008/105/CE estabelece normas de qualidade ambiental para substâncias prioritárias, incluindo o nonilfenol. Essa diretiva fixa o limite máximo de concentração de 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o NP em águas superficiais, visando proteger os ecossistemas aquáticos e a saúde humana. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) estabeleceu critérios de qualidade da água para o nonilfenol, visando proteger a vida aquática. De acordo com essas diretrizes da EPA (US EPA, 2005), a concentração máxima e segura de NP para ambientes dulcícolas é de 28  $\mu\text{g L}^{-1}$  por até 1 h, enquanto a concentração contínua máxima é de 6,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esses valores foram determinados com base em estudos toxicológicos com modelos de peixes, invertebrados e plantas, para garantir a proteção dos recursos aquáticos. Adicionalmente, 28  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NP enquadra-se como uma concentração potável para a população, segundo os critérios de qualidade de água da US EPA. No Canadá, o NP e seus etoxilados são considerados substâncias tóxicas sob a regulação do Conselho Canadense do Ministério do Ambiente (CCMA), o qual recomenda como concentração máxima o valor de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NP em águas superficiais (CCMA, 2002). Além disso, o Canadá implementou regulamentos para reduzir a liberação desses compostos no meio ambiente, incluindo restrições ao uso de NPE em determinados produtos e processos industriais.

No contexto brasileiro, não há uma regulamentação específica para o NP e seus etoxilados na água. A resolução nº357/2005 do CONAMA, que compreende a legislação sobre ambientes dulcícolas e o controle do lançamento de efluentes, não inclui o NP e o NPE, além de outros disruptores endócrinos. Portanto, no Brasil o NPE é considerado um CE. Estudos realizados no país têm detectado a presença de NP nas águas brasileiras, especialmente em regiões com alta densidade populacional e atividades industriais intensas. O trabalho de Moura (2008) avaliou as concentrações de NP e de seus etoxilados NPEO1 e NPEO2 em amostras de afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto em 5 cidades do interior do estado de São Paulo. As concentrações de NP em afluentes e efluentes dos pontos de coleta variou de 1,3 a 117  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,8 a 267  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Já os compostos etoxilados presentes nos

afluentes, a concentração variou de 4,5 a 2.963  $\mu\text{g L}^{-1}$  e nos efluentes de 1,9 a 369  $\mu\text{g L}^{-1}$ . De maneira similar, Franco (2013) detectou NP em concentrações de 20 e 35,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  em diferentes pontos de amostragem de águas superficiais no Ribeirão das Cruzes (UGRHI-13), em Araraquara (SP). Na região metropolitana de Belo Horizonte (MG), Alves et al. (2022) detectaram concentrações de NP variando de 2,1 a 8,5  $\text{ng L}^{-1}$  em estações de tratamento de água.

A preocupação acerca do despejo em efluentes do NPE aumentou após a pandemia de COVID-19, uma vez que aumentou o uso de produtos sanitários, com estudos destacando elevações na deposição de compostos surfactantes em ambientes aquáticos durante e após esse período (ALYGIZAKIS et al., 2021; ABBASI; SICAKYÜZ, 2024), devido à sua extensa utilização em produtos de higiene e sanitários.

**Figura 3.** Representação de como as vias (hospitalar, industrial e doméstica) de despejos do NPE pode atingir as populações de anfíbios.



**Fonte:** elaborado pelo autor com figuras de acesso livre.

A grande maioria dos estudos sobre os impactos do NP e NPE em anfíbios estão centrados na elucidação dos seus efeitos na metamorfose e desenvolvimento, sobretudo em suas ações em atuar como disruptores endócrinos (PARK et al., 2010; XU et al., 2019). Há, portanto, uma lacuna no conhecimento desenvolvido de suas possíveis ações em diferentes tecidos e sistemas, sobretudo em níveis subletais, dentro dos padrões regulatórios internacionais e ambientalmente relevantes. Essas avaliações são essenciais para compreender os impactos ecotoxicológicos desses compostos em organismos aquáticos e para subsidiar políticas de controle e mitigação de riscos ambientais.

### 1.3 Mudanças climáticas

Como consequência das mudanças ambientais antropogênicas, o mundo enfrenta o aquecimento global, impulsionado principalmente pela emissão de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e o metano (CH<sub>4</sub>) (FILONCHYK et al., 2024). Essas alterações incluem o aumento da temperatura média do planeta, mudanças nos padrões de precipitação, elevação no nível dos oceanos e eventos climáticos extremos, como secas prolongadas e tempestades intensas (LOAICIGA et al., 1996; WETHERALD; MANABE, 2000; MA et al. 2020). Esses fenômenos têm impactos profundos e interconectados sobre os ecossistemas aquáticos continentais, que incluem ambientes lóticos (rios e córregos) e lênticos (lagos, lagoas e reservatórios), os quais são essenciais para a manutenção da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos (CARPENTER et al., 1992; MATTHEWS, 2010).

Segundo as projeções *Shared Socio-Economic Pathways* (SSPs) para o ano de 2100 elaboradas pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2023), em um cenário de baixas emissões (SSP1-1.9) águas continentais em regiões tropicais podem aumentar de 1,0°C a 1,5°C, atingindo temperaturas de 26°C a 31°C. No cenário intermediário (SSP2-4.5), esses mesmos ambientes podem variar a temperatura de 1,5°C a 2,5°C, podendo chegar a 33°C nessas regiões. E em um cenário de altas emissões (SSP5-8.5) o aumento da temperatura das águas superficiais tropicais podem variar de 2,5°C a 4,0°C, atingindo temperaturas de 29°C a 35°C até 2100. Portanto até o ano de 2100 segundo o IPCC (2023), a temperatura média das águas superficiais (oceanos e águas continentais) podem aquecer entre 1,0°C e 4,0°C, dependendo do cenário de emissões de gases de efeito estudo. Essas mudanças terão impactos profundos sobre a biodiversidade aquática, os ciclos biogeoquímicos e os serviços ecossistêmicos, reforçando a necessidade de ações urgentes para mitigar as mudanças climáticas.

**Figura 4.** Representação dos impactos do aquecimento das águas superficiais sobre a riqueza de espécies e a seleção de espécies resistentes a altas temperaturas. À esquerda, observa-se um cenário com temperatura ambiental normal, onde há uma maior diversidade de espécies coexistindo. À direita, ilustra-se um cenário de temperatura elevada, no qual a riqueza de espécies diminui significativamente, favorecendo a predominância de espécies adaptadas ou resistentes a condições térmicas mais extremas.



**Fonte:** elaborado pelo autor com figuras de acesso livre.

Um dos principais aspectos emergentes das mudanças climáticas, são as alterações nos regimes hidrológicos, como a frequência e a intensidade de chuvas, o que pode levar a eventos de inundações ou secas extremas (BILHAJ et al., 2021). Em ambientes lóticos, inundações podem causar a lixiviação de poluentes e sedimentos de áreas adjacentes, aumentando a carga de contaminantes químicos nos rios e córregos (NOYES et al., 2009). Em ambientes lênticos, como lagos e reservatórios, a redução do volume de água durante períodos de seca pode concentrar contaminantes (MATTHEWS, 2010). Essas alterações não apenas afetam a qualidade da água, mas também amplificam os impactos da contaminação química sobre a biota aquática, podendo levar à biomagnificação de substâncias tóxicas na cadeia alimentar.

Miller et al. (2018) focaram em estimar a magnitude e a direção dos efeitos dos fatores climáticos sobre as mudanças populacionais, considerando como esses fatores afetam a disponibilidade de habitat e a sobrevivência em diferentes estágios de vida dos anfíbios. Esse trabalho analisou mudanças populacionais em nível de ocupação de habitats, permitindo prever mudanças na riqueza de espécies e na extensão de seus habitats. Em geral, os anfíbios responderam conforme o esperado: maior disponibilidade de água durante a reprodução teve efeito positivo, especialmente em regiões quentes e secas. Portanto, as alterações no fluxo hidrológico são um fator importante para a sobrevivência das espécies de anfíbios.

Muitas espécies aquáticas são ectotérmicas, o que as torna altamente sensíveis a variações térmicas, uma vez que os processos fisiológicos fundamentais, como metabolismo, reprodução e crescimento, são diretamente regulados pela temperatura ambiental (BURRACO et al., 2020). Em anfíbios, mudanças na temperatura podem influenciar significativamente o tempo necessário para a metamorfose, as taxas de crescimento e o tamanho corporal dos indivíduos adultos, impactando diretamente sua aptidão e sucesso reprodutivo (POTTIER et al., 2024). De acordo com Angilletta (2009), a tolerância térmica de um organismo é definida como a faixa de temperatura na qual suas atividades vitais e sobrevivência são viáveis, sendo um fator crucial para sua distribuição geográfica. Além disso, o ótimo térmico, que corresponde à temperatura de máxima eficiência fisiológica, está diretamente relacionado à temperatura preferencial de espécies ectotérmicas. A interação entre tolerância térmica e ótimo térmico é essencial para compreender os impactos das mudanças climáticas, particularmente do aquecimento global, sobre a sobrevivência e a persistência das espécies em seus habitats naturais.

Além disso, o aumento da temperatura pode intensificar a toxicidade de contaminantes químicos (NOYES et al., 2009), que se tornam mais biodisponíveis e reativos em águas aquecidas, exacerbando seus efeitos nocivos sobre a biota. Isso é particularmente preocupante

para os anfíbios, cujos estágios larvais, mais vulneráveis, estão expostos a uma série de estressores ambientais, além de dependerem completamente do meio aquático para sua sobrevivência e desenvolvimento.

De acordo com a revisão de Pinheiro et al. (2021) sobre a influência das variações físico-químicas da água na toxicidade de contaminantes para a vida selvagem, há preocupações significativas em relação às mudanças na temperatura da água. No contexto das mudanças climáticas, alterações nas propriedades físico-químicas, como variações de temperatura, pH e O<sub>2</sub> dissolvido, podem intensificar os efeitos da poluição, aumentando os riscos para os ecossistemas de água doce. Diante desse cenário, há uma necessidade urgente de estudos que integrem mudanças climáticas e a toxicidade de poluentes, especialmente os de caráter emergente, com o objetivo de prever e mitigar impactos futuros. Assim, investir em pesquisas que explorem essas interações complexas, desenvolver métodos avançados para modelar riscos de poluentes em cenários futuros e integrar dados globais para criar avaliações de risco mais precisas e realistas, se torna essencial para garantir a saúde e a sustentabilidade dos ecossistemas dulcícolas.

Portanto, o aquecimento global, combinado com as atividades antrópicas, pode agravar a perda de habitats aquáticos essenciais, como zonas úmidas e margens de rios, que desempenham papéis cruciais na reprodução e no abrigo de diversas espécies de anfíbios. A interação entre esses fatores e a contínua contaminação química pode resultar na diminuição da biodiversidade, extinção de espécies mais sensíveis e proliferação de espécies invasoras, mais tolerantes às novas condições climáticas e antropogênicas.

#### ***1.4 Justificativa***

Com o avanço do conhecimento sobre a complexidade dos sistemas ecológicos, consolidou-se a compreensão de que o declínio das populações de anfíbios não pode ser atribuído a um único fator isolado, mas sim a interações multifatoriais e sinérgicas entre diversos estressores ambientais.

Pesquisas têm evidenciado que os anfíbios são especialmente vulneráveis à exposição ao NPE (PERROTA; TRIPEPI, 2012; BERNABÓ et al., 2014; GONÇALVES et al., 2025), com estudos que abrangem não apenas sua ação xenoestrógena, mas também outros efeitos tóxicos. Além disso, é necessário subsidiar resultados sobre a toxicidade do NPE em organismos aquáticos que estão expostos a concentrações cada vez mais crescentes desse CE, principalmente no período pós-pandêmico e em países sem regulamentações para suas

concentrações nos ambientes aquáticos.

Até o momento, não há estudos na literatura que investiguem os efeitos sinérgicos do NPE e da temperatura em modelos de anfíbios. A análise dos impactos combinados desses fatores sobre girinos de *A. catesbeiana*, pode contribuir para o avanço do conhecimento sobre como as espécies de anfíbios respondem a ambientes multiestressores. Há a necessidade de avaliar os efeitos da exposição a contaminantes em diferentes espécies, para compreender a vulnerabilidade dos organismos aquáticos frente às mudanças climáticas em andamento (MONTEIRO et al., 2021). Uma abordagem com múltiplos biomarcadores pode elucidar como os estressores interagem em diversos tecidos e processos fisiológicos e bioquímicos de forma sistêmica. A faixa térmica preferencial dos girinos de rã-touro em estágios posteriores ao estágio 20 de Gosner, fica entre 25°C e 28°C (WOLLMUTH; CRAWSHAW, 1988) e a temperatura crítica máxima da espécie em estágios pré-metamórficos é de 36-37 °C (MENKE; CLAUSSEN, 1982; BRATTSTROM, 1986). Dessa forma, a exposição a uma temperatura mais elevada, como 30°C, pode induzir estresse térmico, simulando cenários reais projetados pelo IPCC (2023) para o aumento das temperaturas das águas continentais em regiões tropicais, como o Brasil. Os resultados permitem inferir as respostas fisiológicas adaptativas que larvas de espécies nativas poderiam enfrentar em contato com o NPE sob condições de aquecimento global, fornecendo subsídios para prever impactos realistas e orientar estratégias de conservação.

### **1.5 Hipótese**

Diante da lacuna de conhecimento sobre os efeitos da exposição aguda ao NPE em múltiplos biomarcadores de girinos, em um cenário de temperaturas elevadas devido ao aquecimento global, surge a hipótese:

- A exposição aguda a concentração ambientalmente relevante de 30 µg L<sup>-1</sup> de NPE a 25°C promove efeitos negativos nos múltiplos biomarcadores em girinos de *Aquarana catesbeiana* e essas respostas seriam potencializadas a 30°C, devido a interação sinérgica entre temperatura e a exposição ao contaminante.

### **1.6 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos subletais da exposição aguda (48 h) ao surfactante NPE (30 µg L<sup>-1</sup>) em duas condições térmicas distintas (25°C e 30°C), bem como a interação entre esses fatores (NPE x temperatura), em múltiplos biomarcadores de girinos de *Aquarana catesbeiana* no

estágio 25 de Gosner.

### 1.6.1 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração real de NPE na água, após a exposição a concentração nominal de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ .
- Avaliar os impactos nos seguintes índices biométricos: fator de condição (K), índice hepatossomático (IHS) e massa ventricular relativa (MVR);
- Avaliar os efeitos das exposições na frequência cardíaca ( $f_H$ );
- Avaliar os efeitos das exposições sobre os parâmetros de contratilidade ventricular *ex vivo*, a saber: força de contração isométrica (Fc), taxas de contração (+dFc/dT) e de relaxamento (-dFc/dT) e índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC);
- Avaliar os efeitos das exposições sobre a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx) nas brânquias, fígado e músculo;
- Quantificar o conteúdo não-enzimático de glutathione reduzida (GSH) nas brânquias, fígado e músculo;
- Determinar os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo: peroxidação lipídica (LPO) e proteína carbonilada (PC) nas brânquias, fígado e músculo;
- Avaliar a neurotoxicidade do contaminante através da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no tecido nervoso e muscular;
- Avaliar a interação entre a temperatura e a exposição ao NPE em todos os biomarcadores.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Animais

Girinos (massa:  $2,1 \pm 0,2$  g; comprimento:  $5,5 \pm 0,7$  cm) de *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) foram adquiridos em um ranário comercial, Ranamat (Matão, SP;  $21^{\circ}65'S$  e  $48^{\circ}38'O$ ). Os animais foram aclimatados até atingirem o estágio de Gosner 25 (Gosner, 1960) em tanques de 500 L equipados com suprimento contínuo de água de clorinizada, aerada ( $P_wO_2 > 100$  mmHg), a uma temperatura constante de  $25^{\circ}C$  ( $25 \pm 1^{\circ}C$ ), sob fotoperíodo natural (~12 h claro: 12 h escuro) e alimentados *ad libitum* com ração comercial (Pro Acqua MP 31, Moinho Primor) contendo 35% de proteína.

**Figura 5.** Exemplos de *Aquarana catesbeiana* no estágio de Gosner 25 empregados no estudo.



**Fonte:** autoria própria.

### 2.2 Delineamento experimental

Os girinos foram expostos a concentração nominal e ambientalmente relevante de  $30 \mu g L^{-1}$  de NP com nove cadeias etoxiladas - NPE (Tergitol NPE9®, Sigma, CAS n°: 127087-87-0), durante 48 h (exposição aguda) a duas temperaturas distintas de  $25^{\circ}C$  e  $30^{\circ}C$ , em aquários e em sistema estático. Segundo o estudo de Staples et al. (1999), o NPE possui uma meia-vida de biodegradação aeróbica de aproximadamente 20 dias em sistemas laboratoriais, o que indica que, dentro do período de 48 horas, não ocorrerá degradação significativa do composto. Dessa forma, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

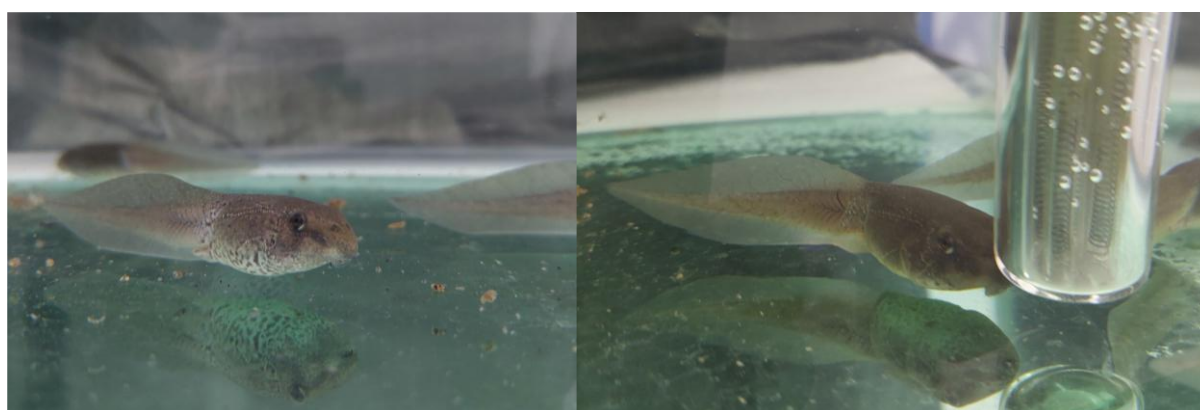
- a. Grupo controle (Ct25, n = 24): girinos expostos em água livre de NPE a  $25^{\circ}C$ ;
- b. Grupo exposto ao NPE (NPE25, n = 24): girinos expostos a  $30 \mu g L^{-1}$  de NPE (Tergitol NPE9®, Sigma) a  $25^{\circ}C$ ;
- c. Grupo controle (Ct30, n = 24): girinos expostos em água livre de NPE a  $30^{\circ}C$ ;

d. Grupo exposto ao NPE (NPE30, n = 24): girinos expostos a 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE (Tergitol NPE9®, Sigma) a 30°C.

Os aspectos metodológicos, como a realização dos ensaios em duplicata, a proporção de um girino por litro, o tempo de exposição aguda (48 h) e o jejum dos girinos durante a exposição, foram estabelecidos de acordo com as normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2000). Os parâmetros de qualidade da água dos ensaios foram monitorados diariamente e mantidos constantes em todos os grupos experimentais. Os valores dos parâmetros físico-químicos mantiveram-se constantes: temperatura, 24,5–25,2°C e 29,1–30,1°C;  $\text{O}_2$  dissolvido, 123–135 mmHg; pH, 6,8–7,5; dureza total, 52–67  $\text{mg L}^{-1}$  ( $\text{CaCO}_3$ ); condutividade, 74–99  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; e amônia total, 0,6–1,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

A concentração de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE foi escolhida baseada em dados na literatura que indicam níveis similares e, até superiores, detectados em estações de tratamento de água brasileiras (MOURA, 2009; ALVES, 2022). A US EPA (2005) estabelece uma das poucas regulamentações internacionais para o nonilfenol e seus etoxilados, tendo como limite máximo e seguro para a biota dulcícola a concentração de 28  $\mu\text{g L}^{-1}$  no período de até 1 hora. Testar essa concentração por 48 h é relevante para avaliar os impactos desse contaminante em cenários de poluição intensa, como os observados no Brasil. Além disso, em um estudo recente do grupo de pesquisa, essa concentração promoveu efeitos cardiotoxicos em girinos de *Aquarana catesbeiana* durante uma exposição subcrônica por 16 dias (GONÇALVES et al., 2025).

**Figura 6.** Girinos de *A. catesbeiana* do grupo controle (a esquerda) e expostos a 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE (a direita) mantidos a 30°C em sistema estático.



**Fonte:** autoria própria.

Após a exposição, os girinos de ambos os grupos experimentais foram eutanasiados por concussão cefálica seguida de transecção da medula espinhal, seguindo as normas da *American Veterinary Medical Association* – AVMA (2001), uma vez que anestésicos interferem na

função cardíaca (MEDLER, 2019). Esses animais foram utilizados para o registro da  $f_H$  e a análise da contratilidade miocárdica *ex-vivo*. Os girinos empregados nas réplicas da exposição foram eutanasiados por superdosagem de anestésico (benzocaína, 0,1%). Em seguida as brânquias, cérebro, fígado, músculo e coração foram removidos, lavados em salina a 0,9%, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C para as análises dos marcadores bioquímicos e neurotóxicos. Todos os protocolos e experimentos foram aprovados previamente pela CEUA da UFSCar (CEUA/UFSCar #1876190520).

### **2.3 Quantificação de NPE na água**

Amostras de água foram coletadas da coluna d'água dos aquários logo após o início das exposições. As análises foram conduzidas no Laboratório Multiusuário HPLC-MS/MS do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), *campus* Araraquara.

A quantificação do NPE foi realizada de acordo com o trabalho de Sodré et al. (2010). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada no equipamento Shimadzu Nexera X2, composto por uma bomba binária LC-30AD, um injetor automático SIL-30AC e um forno de coluna CTO-20A. Esse sistema é acoplado ao espectômetro de massas em tandem (MS/MS) 3200 QTRAP (AB SCIEX) com *trap* linear de íons quadrupolo. O volume de injeção foi de 5  $\mu$ L, e a separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Kinetex C18 (2,6  $\mu$ m  $\times$  50 mm  $\times$  2,1 mm), mantida a 40°C. A fase móvel consistiu em H<sub>2</sub>O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi mantido em 0,5 mL min<sup>-1</sup>, e a separação foi realizada por cromatografia de fase reversa com o seguinte gradiente: de 65% B para 100% B em 3 min, mantido em 100% B por 1 min, retornando a 65% B em 0,5 min e estabilizando por 3,5 min. A ionização foi conduzida por electrospray no modo positivo, com os seguintes parâmetros: pressão do gás nebulizador de 50 psi, temperatura do gás de secagem de 650°C e voltagem do capilar de 5500 V. Para a quantificação do NPE, o íon precursor foi monitorado em 634,5 m/z, e o íon produto em 89,3 m/z, com um *dwell time* de 100 ms.

### **2.4 Índices biométricos**

A biometria dos animais ensaiados foi realizada, medindo-se a massa e comprimento total dos girinos, a massa dos fígados e ventrículos. Com os resultados da biometria foi possível calcular fator de condição de Fulton [ $K = 100 \times \text{massa do corpo (g)} / (\text{tamanho do corpo})^3$ ], o índice hepático-somático [IHS = (peso do fígado/peso do peixe)  $\times$  (100)] (HEGDE;

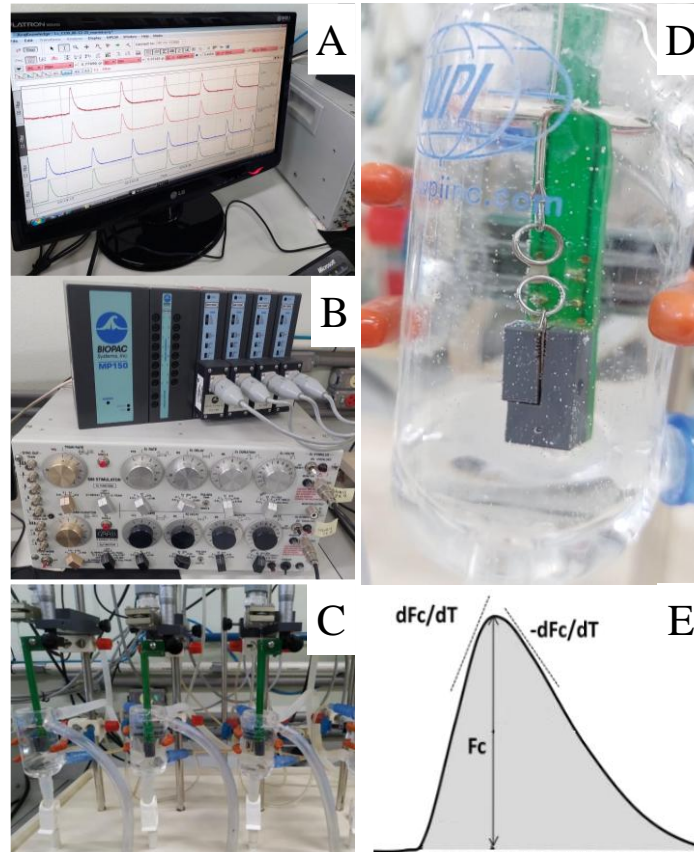
KRISHNAMURTHY, 2014) e a massa ventricular relativa [MVR = (massa do ventrículo/massa do girino) x (100)] (COSTA et al., 2015).

## 2.5 Biomarcadores fisiológicos

Após a eutanásia, a  $f_H$  in loco foi avaliada por observação direta (3 minutos) e registrada em batimentos por minuto (bpm). As medições foram realizadas posicionando os indivíduos em recipientes de contenção preenchidos com solução ringer, adaptados a partir de placas de Petri. A cavidade celomática foi aberta cirurgicamente em direção caudal-cranial para expor o pericárdio, possibilitando a visualização dos batimentos cardíacos (DAL-MEDICO et al., 2014; SALLA et al., 2015). Essa análise apresenta resultados sobre a frequência cardíaca basal, dito que evita os efeitos adrenérgicos induzidos por estresse devido à implantação de eletrodos de eletrocardiografia subcutâneos (SALLA et al., 2015).

Após o registro da  $f_H$ , os ventrículos foram isolados cirurgicamente e transferidos para uma solução ringer própria para a espécie, com a seguinte composição (mM): 115 NaCl, 5 KCl, 30 NaHCO<sub>3</sub>, 0,94 MgSO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub> de acordo com os procedimentos delineados por Costa et al. (2008) e Monteiro et al. (2017). As extremidades dos ventrículos foram presas em espirais metálicas e as preparações foram então suspensas verticalmente em uma cubeta contendo solução Ringer termostatizada à 25°C ou à 30°C, dotada do borbulhamento constante de uma mistura carbogênica (2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>). Uma extremidade foi conectada a um transdutor de força isométrica por meio de um fio de aço inoxidável. A outra espiral metálica foi fixada a um gancho próximo a eletrodos de estimulação. Os eletrodos de estimulação foram acoplados a um estimulador elétrico (Grass S88, Grass Technologies, USA), que forneceu pulsos elétricos de 8 ms de duração a uma voltagem de 60 V e uma corrente de 150 mA. Os transdutores de força isométrica (Grass FT.03 Transducer, Grass Technologies, USA) foram acoplados ao sistema de aquisição e análise de dados Biopac MP150 (Biopac Systems, Inc., USA) por meio do software AcqKnowledge (Biopac Systems Inc., USA). Inicialmente, os ventrículos foram estimulados a uma frequência de 12 bpm (0,2 Hz, *steady-state*) e microestirados, até que uma relação constante entre os ventrículos foram submetidos a incrementos sucessivos de 0,2 Hz na frequência de estimulação até os registros de contrações se tornarem irregulares a fim de obter a relação força-frequência. Esse protocolo permite avaliar a capacidade do miocárdio em manter o acoplamento excitação-contração (AE-C) em frequências sub-fisiológicas, fisiológicas e supra-fisiológicas.

**Figura 7.** *Set up* para análises de contratilidade ventricular *ex vivo*. (A) registro das contrações isométricas; (B) sistema de aquisição de dados BIOPAC 150 (acima) e estimulador elétrico Grass S88 (abaixo); (C) cubetas contendo hastes para o micro estiramento dos ventrículos acopladas aos transdutores de força de contração isométrica (Grass FT.03 *Transducer*); (D) ventrículo de girino preso entre duas espeirais dentro da cubeta contendo solução Ringer, com eletrodos próximos ao ventrículo e o borbulhamento de mistura carbogênica; (E) parâmetros de contratilidade ventricular gerados pelos registros de contração.



**Fonte:** (Fig. A, B, C e D) elaborado pelo autor (Fig. E) modificado de Monteiro (2011).

A área da seção transversa foi calculada utilizando o comprimento e massa úmida de cada preparação ventricular e a densidade muscular de  $1,06 \text{ g cm}^{-3}$  (LAYLAND et al., 1995). A força de contração ( $F_c - \text{mN mm}^{-1}$ ) foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e da tensão de repouso. Os parâmetros tempo dependentes foram analisados e expressos em taxas de contração ( $+dF_c/dT - \text{derivada máxima positiva} - \text{mN mm}^{-2} \text{ ms}^{-1}$ ) e de relaxamento ( $-dF_c/dT - \text{derivada máxima negativa} - \text{mN mm}^{-2} \text{ ms}^{-1}$ ). O produto da  $F_c$  pela frequência de estimulação foi usado para determinar o índice de capacidade de bombeamento cardíaco ( $\text{CBC} - \text{mN mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) (MATIKAINEN; VORNANEN, 1992).

## 2.6 Biomarcadores bioquímicos

Todas as análises foram realizadas em duplicatas a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices, EUA) ou um espectrofotômetro UV-Vis (BEL Engineering, Itália). As amostras de brânquias, fígado e músculo congeladas

foram homogeneizadas a 18.000 rpm utilizando o Turrattec TE 102 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) em um tampão fosfato  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  0,1 M em pH 7.0 contendo PMSF, na proporção de 1:5 w/v. Após centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C, os sobrenadantes obtidos foram utilizados nas análises detalhadas a seguir.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada seguindo o método descrito por Flohé e Ötting (1984), baseado na taxa de redução de citocromo c por ânions superóxido no comprimento de 550 nm. A mistura de reação foi composta por tampão fosfato  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  50 mM (pH 7,8) contendo 0,1 mM de EDTA, 1 mM de xantina, 20 mM de citocromo c, 0,2 U  $\text{ml}^{-1}$  de xantina oxidase e o homogeneizado. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a redução do citocromo c e expressa como U de SOD por mg de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada pela medida do consumo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 240 nm, utilizando a metodologia descrita por Aebi (1974). A mistura de reação consistiu em tampão fosfato sódico 50 mM (pH 7,0), 15 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o extrato enzimático. Os valores de CAT foram quantificados em unidade de Bergmeyer (BU), definida como a quantidade de enzima que libera metade do  $\text{O}_2$  da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 30s e expressa como UB de CAT por mg de proteína.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi avaliada monitorando a oxidação de NADPH a 340 nm em um meio contendo tampão fosfato  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  50 mM (pH 7,0), 1 mM de EDTA, 0,2 mM de NADPH, 1 mM de azida sódica, 1 U  $\text{ml}^{-1}$  de glutathiona redutase (GR) e 1 mM de glutathiona reduzida (GSH). A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e homogeneizados (NAKAMURA et al., 1974). Uma unidade foi calculada como a quantidade da enzima que causa o consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM cm}^{-1}$ . A atividade da GPx foi expressa como mU de GPx por mg de proteína.

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi determinada seguindo o protocolo estabelecido por Habig et al. (1974). A mistura reativa foi composta por 1 mM de 1 cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de GSH, 100 mM de tampão fosfato  $\text{K}^+$  (pH 7,0) e o extrato enzimático. A formação do produto S-2,4-dinitrofenil glutathiona foi monitorada pelo aumento na absorbância a 340 nm. A quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto foi definida como uma unidade de GST, utilizando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mM cm}^{-1}$ . A atividade da GST foi expressa como mU de GST por mg de proteína.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram quantificados utilizando o reagente de

Ellman, seguindo os protocolos descritos por Beutler et al. (1963), Wilhelm-Filho (1996) e Wilhelm-Filho et al. (2005). As amostras, pré-tratadas com ácido tricloroacético (TCA) a 12%, foram misturadas com 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0,25 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 8,0). O DTNB reage com os grupos tiol da GSH, sofrendo uma clivagem redox pela GSH, formando ânion tiolato (TNB<sup>-</sup>). O TNB<sup>-</sup> absorve luz no comprimento de onda de 412 nm, permitindo a quantificação do tripeptídeo por comparação com uma curva padrão de GSH. A quantidade de GSH foi expressa em nmol de GSH por mg de proteína.

O conteúdo de lipoperoxidação (LPO) foi determinado incubando, por 45 minutos, 100 µL da amostra (previamente desproteïnizada com ácido tricloroacético 10%) a 900 µL de uma mistura reativa contendo 0,25 mM de FeSO<sub>4</sub>, 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 mM de alaranjado de xilenol e 4 mM de hidroxibutiltolueno em 90% (v/v) de metanol, conforme descrito por Jiang et al. (1992). Esse método é baseado na oxidação do Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe<sup>3+</sup>, o alaranjado de xilenol, que tem pico de absorção a 560 nm. A concentração de hidroperóxidos nas amostras foi determinada a partir de curva analítica com hidroperóxido de cumeno (CHP). Os níveis de LPO foram expressos em nmol de CHP por mg de proteína.

A determinação do conteúdo de proteína carbonilada (PC) foi realizada conforme metodologia proposta por Reznick e Packer (1994), baseada na reação de grupos carbonila oxidados presentes nas proteínas com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 10 mM em HCl 2,5 M. Em seguida, as amostras foram tratadas com TCA 50% e, para garantir a solubilização e estabilização dos complexos proteína-DNPH, utilizou-se o cloridrato de guanidina a 6 M, promovendo a exposição máxima dos sítios carbonilados. A quantidade de carbonilas foi medida a 370 nm, empregando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM cm}^{-1}$  e expressa em nmol de PC por mg de proteína.

A quantificação de proteína total nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) adaptado para um leitor de microplacas (Kruger, 1994), utilizando o azul brilhante de Coomassie G 250, utilizando-se albumina bovina como padrão. A absorbância das amostras foi registrada a 595 nm.

## **2.7 Biomarcadores neurotóxicos**

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo e cérebro dos animais, foi avaliada seguindo o método descrito por Ellman et al. (1961). Os tecidos foram homogeneizados 1:4 w/v em tampão fosfato 0,1 M, pH 8. Após a centrifugação 10.000 rpm por 10 min a 4°C o sobrenadante foi obtido para a análise e a quantificação de proteínas totais,

conforme descrição anterior. A mistura reativa continha tampão fosfato 0,1 M (pH 8), DTNB 0,33 mM e o sobrenadante dos homogeneizados. A reação foi iniciada pela adição iodeto de acetilcolina (ACh) a 0,5 mM. A hidrólise de ACh foi monitorada pelo aumento da absorbância em 412 nm por 120 s. Uma unidade de AChE foi expressa como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de ACh por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{412} = 73,53 \text{ nmol cm}^{-1}$ .

## **2.8 Análise estatística dos dados**

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para avaliar a interação entre a temperatura e a exposição ao NPE, foi aplicado a análise de variância ANOVA *two-way*, complementada pelo teste de Fisher para identificar as diferenças entre os grupos experimentais. Adicionalmente, para analisar o comportamento do parâmetro de contratilidade ao longo dos incrementos na frequência de estimulação, foi realizada uma análise de variância (ANOVA de medidas repetidas, *one-way*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism (GraphPad InStat version 8.00, GraphPad Software, USA). As diferenças entre as médias ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) foram consideradas significativas.

### 3 Resultados

#### 3.4 Alterações comportamentais durante a exposição e níveis de NPE na água

Durante o período de exposição (48 h) não houve mortalidade em nenhum dos grupos experimentais. Entretanto, os grupos controle e exposto ao NPE mantidos a 30°C exibiram uma atividade natatória mais intensa e maior agitação em comparação aos animais mantidos a 25°C.

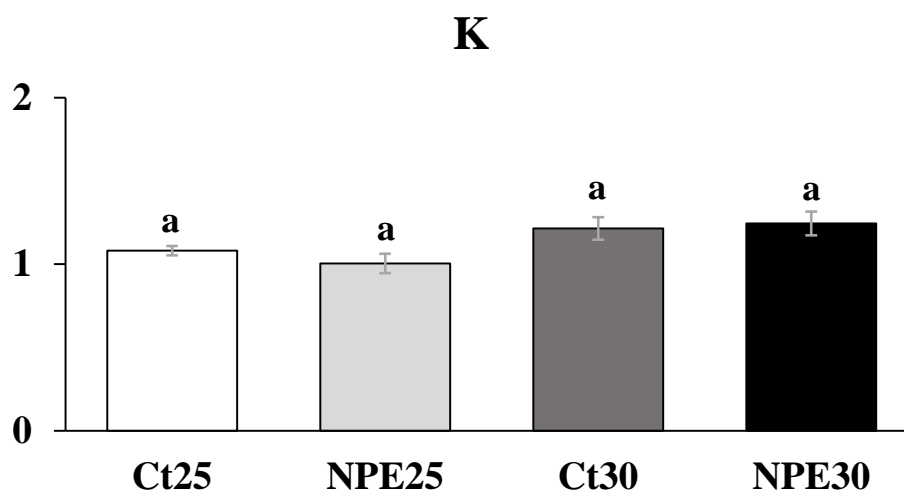
A análise por HPLC-MS/MS indicou que a concentração real média de NPE nos aquários experimentais, independentemente da temperatura, foi de  $24,8 \pm 3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , a partir da concentração nominal de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 3.5 Índices biométricos

##### 3.5.1 Fator de condição de Fulton (K)

Nenhuma diferença significativa foi observada nos valores do fator K entre os diferentes grupos experimentais (**Fig. 8**). Além disso, não houve interação entre a exposição ao NPE e a temperatura para esse parâmetro (**Tab. 1**).

**Figura 8.** Fator de condição de Fulton (K) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

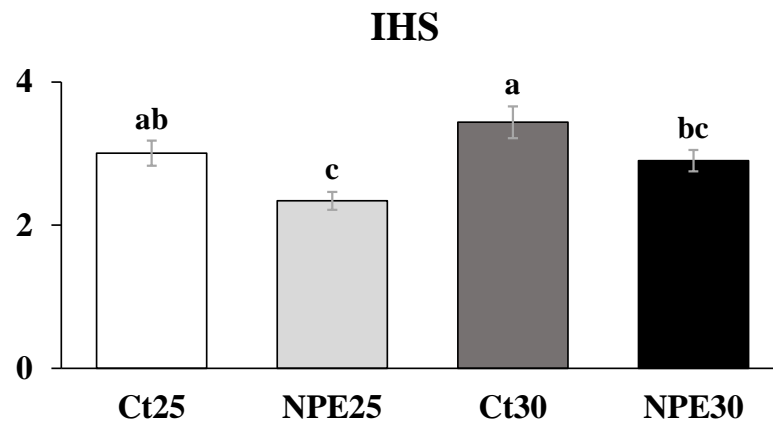


##### 3.5.2 Índice hepatossomático (IHS)

A exposição ao NPE a 25°C (NPE25) resultou em uma redução significativa (22%) no

IHS em comparação ao grupo controle correspondente (Ct25) (**Fig. 9**). De forma similar, na temperatura de 30°C, os animais expostos (NPE30) apresentaram uma diminuição significativa (**16%**) no IHS em relação ao controle nessa temperatura (Ct30). Não foi observado interação entre a exposição ao NPE e a temperatura para o IHS (**Tab. 1**).

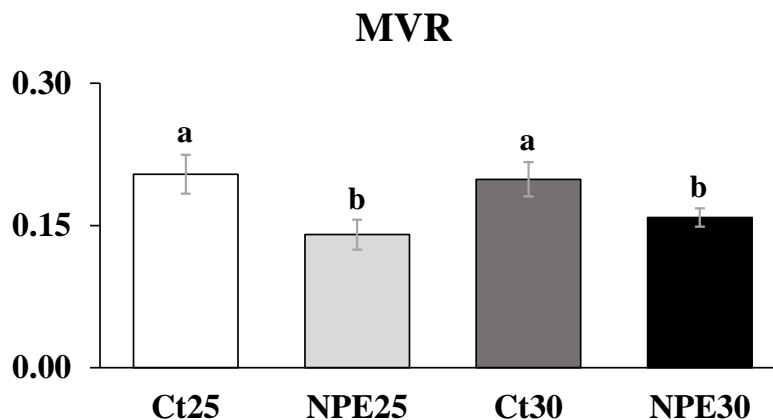
**Figura 9.** Índice hepatossomático (IHS) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



### 3.5.3 Massa ventricular relativa (MVR)

Os animais expostos ao NPE a 25° (NPE25) exibiram uma redução significativa (**31%**) na MVR em relação ao grupo controle (CT25) mantido na mesma temperatura (**Fig. 10**). De forma semelhante, na temperatura de 30°C, o grupo exposto ao NPE (NPE30) também exibiu uma redução significativa (**20%**) na massa ventricular em relação ao controle correspondente (Ct30). Não foi observado interação entre os fatores de temperatura e exposição ao NPE para esse parâmetro (**Tab. 1**).

**Figura 10.** Massa ventricular relativa (MVR) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. Valores expressos em média ± E.P.M. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 1.** Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* para os parâmetros K, IHS e MVR obtidos de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). Valores médios ± EPM. (\*) indica diferença significativa entre o grupo exposto e controle na mesma temperatura.

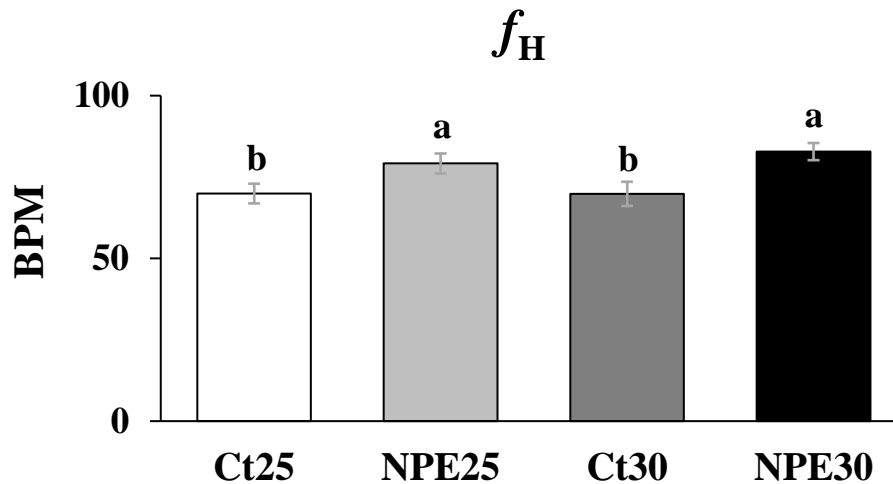
Índices	CT25	NPE25	CT30	NPE30	Interação
K	1,08 ± 0,02	1,00 ± 0,05	1,21 ± 0,06	1,24 ± 0,07	0,4908
IHS	3,01 ± 0,61	2,34 ± 0,43 *	3,44 ± 0,94	2,90 ± 0,72 *	0,6101
MVR	0,20 ± 0,07	0,14 ± 0,05 *	0,20 ± 0,07	0,16 ± 0,05 *	0,5146

### 3.6 Biomarcadores fisiológicos

#### 3.6.1 Frequência cardíaca *in loco* ( $f_H$ )

Os animais expostos ao NPE a 25°C (NPE25) apresentaram um aumento significativo (13%) na  $f_H$  em relação ao grupo controle (Ct25) (**Fig. 11**). Da mesma forma, os girinos expostos ao contaminante (NPE30) a 30°C, demonstraram um cronotropismo positivo (19%) em relação ao grupo controle correspondente à mesma temperatura (Ct30). Não houve interação entre os fatores temperatura e a exposição ao contaminante para a  $f_H$  ( $p = 0,5384$ ).

**Figura 11.** Frequência cardíaca *in loco* ( $f_H$ ) em batimentos por minuto (BPM) de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



### 3.6.2 Parâmetros de contratilidade ventricular

A **Fig. 12** apresenta os valores médios de  $F_c$ , CBC, taxas de contração e relaxamento das tiras ventriculares dos animais do grupo controle (Ct25) e exposto (NPE25) mantidos na temperatura de 25°C, sujeitas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) para obtenção da relação força-frequência.

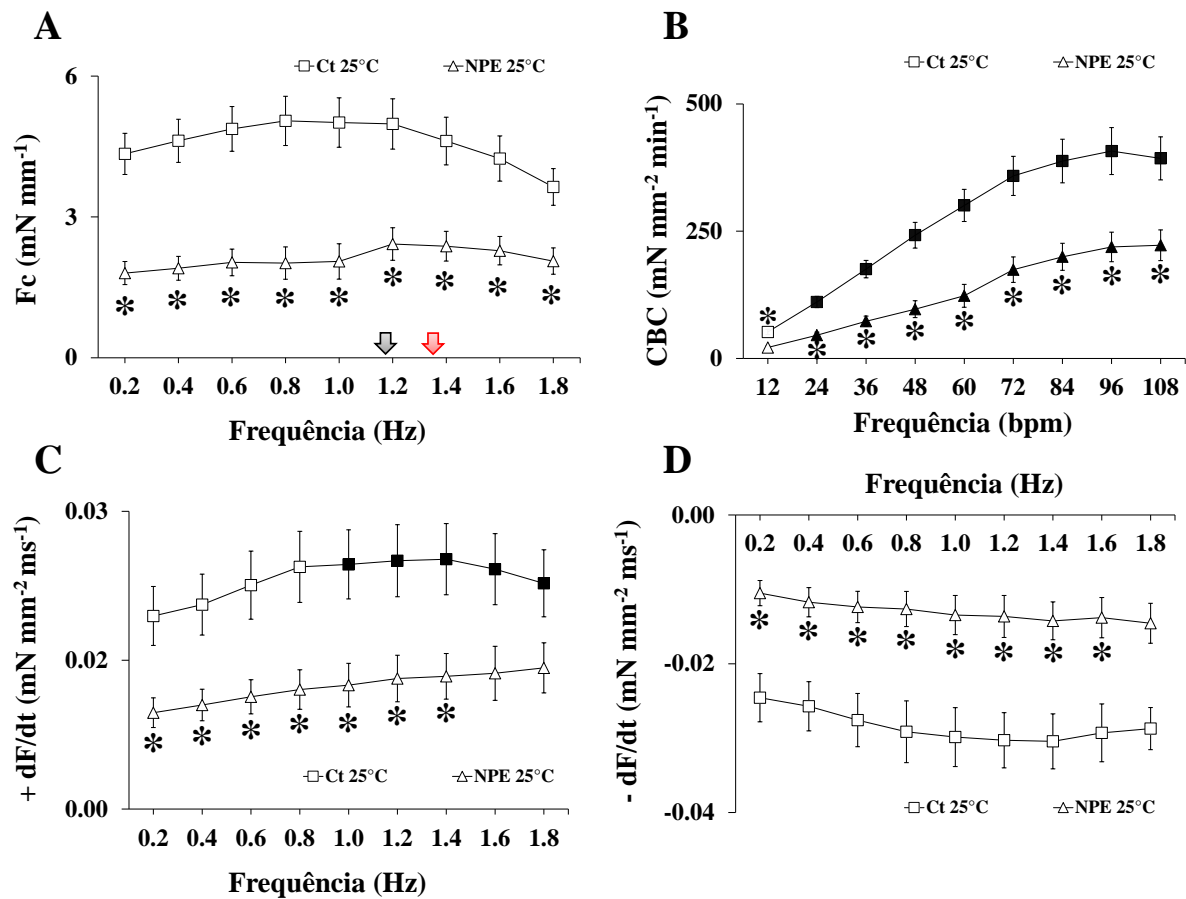
Ambos os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas na  $F_c$  o longo dos incrementos na frequência de estimulação em relação aos seus valores iniciais em 0,2 Hz (**Fig. 12A**) a. O grupo exposto NPE25, exibiu valores da  $F_c$  significativamente menores (54%) em relação ao grupo Ct25, em todas as frequências de estimulação elétrica (0,2 Hz – 1,8 Hz). Na frequência fisiológica (~1,2 Hz ou 72 bpm), os animais do grupo Ct25 apresentaram valores de  $F_c$  de  $5,0 \pm 0,5$  mN mm<sup>-1</sup>, enquanto os girinos do grupo NPE25 mostraram uma média de  $2,4 \pm 0,3$  mN mm<sup>-1</sup> nessa frequência.

Em relação a CBC, ambos os grupos Ct25 e NPE25, apresentaram um aumento progressivo em relação aos seus valores iniciais (12 bpm) a partir de 24 até 108 bpm (**Fig. 12B**). De maneira similar a  $F_c$ , os animais do grupo NPE25 exibiram valores da CBC inferiores (52%) ao grupo Ct25 em todas as frequências de estimulação (12 a 108 bpm). Na frequência fisiológica da espécie (~72 bpm), o grupo Ct25 apresentou uma CBC de  $359 \pm 38$  mN mm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>, enquanto no grupo exposto NPE25 a CBC foi de  $174 \pm 25$  mN mm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> nessa frequência.

A taxa de contração do grupo Ct25 exibiu um aumento significativo em relação ao valor inicial (0,2 Hz) a partir de 1,0 Hz até 1,8 Hz (**Fig. 12C**). O grupo exposto NPE25, não demonstrou alterações ao longo da frequência de estimulação em relação ao seu valor inicial. Contudo, os valores da taxa de contração no grupo NPE25 foram significativamente inferiores (47%) em relação ao grupo Ct25, de 0,2 Hz a 1,4 Hz. Na frequência fisiológica (~72 bpm), a taxa de contração dos animais do grupo Ct25 foi de  $0,025 \pm 0,004 \text{ mN mm}^{-2} \text{ ms}^{-1}$ , enquanto o grupo NPE25 exibiu o valor médio de  $0,013 \pm 0,002 \text{ mN mm}^{-2} \text{ ms}^{-1}$  na mesma frequência.

Em relação a taxa de relaxamento, os dois grupos Ct25 e NPE25, não apresentaram diferenças significativas ao longo dos incrementos de estimulação quando comparados aos seus valores iniciais em 0,2 Hz (**Fig. 12D**). Entretanto, o grupo NPE25 exibiu valores significativamente inferiores (54%) aos valores de taxa de relaxamento do grupo Ct25, de 0,2 Hz a 1,6 Hz. Em 1,2 Hz, frequência fisiológica, o valor dessa taxa no grupo Ct25 foi  $-0,030 \pm 0,004 \text{ mN mm}^{-2} \text{ ms}^{-1}$ , enquanto no grupo NPE25 foi  $-0,014 \pm 0,003 \text{ mN mm}^{-2} \text{ ms}^{-1}$ .

**Figura 12.** (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *Aquarana catesbeiana* mantidos a 25°C, no grupo controle (Ct25, n=12) e no grupo exposto (NPE25, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 1,8 Hz). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Símbolos fechados indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos a 0,2 Hz (12 bpm) no mesmo grupo. Setas indicam a  $f_H$  registradas para o grupo controle (preta) e exposto (vermelha). (\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na mesma frequência entre os grupos experimentais Ct25 e NPE25.



A **Fig. 13** apresenta os valores médios de Fc, CBC e as taxas de contração e relaxamento das preparações ventriculares de girinos pertencentes aos grupos controle (Ct30) e exposto ao NPE (NPE30), ambos mantidos a 30°C. Esses parâmetros foram avaliados sob incrementos progressivos de 0,2 Hz (12 bpm) no protocolo força-frequência.

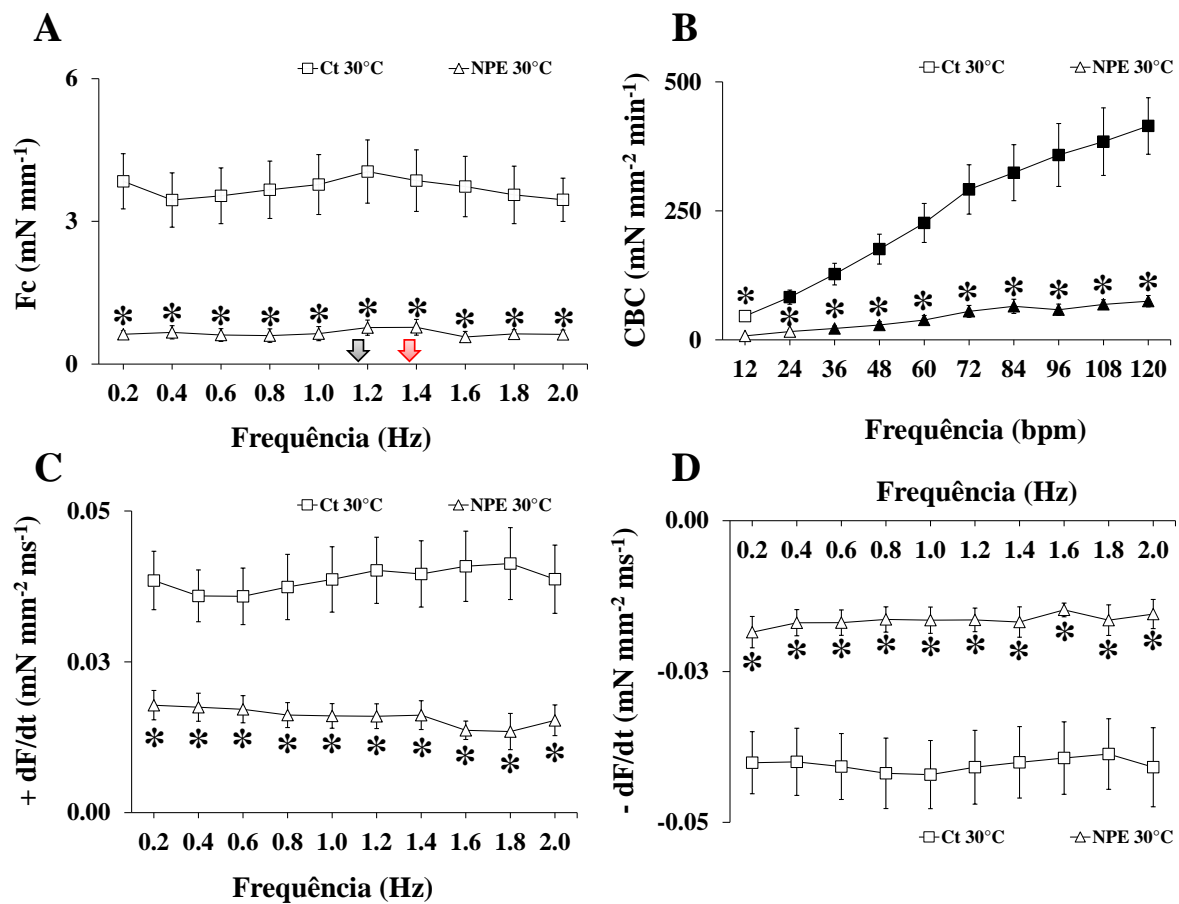
Os dois grupos experimentais, Ct30 e NPE30, apresentaram valores constantes da Fc ao longo dos incrementos de estimulação, em comparação com os valores iniciais registrados a 0,2 Hz (**Fig. 13A**). O grupo NPE30 exibiu valores de Fc significativamente inferiores (82%) em relação ao grupo Ct30 em todas as frequências de estimulação (0,2 a 2,0 Hz). Na frequência fisiológica da espécie (1,2 Hz), o grupo Ct30 exibiu uma média de Fc de  $4,05 \pm 0,7$  mN mm<sup>-1</sup>, enquanto no grupo NPE30 a Fc foi de  $0,77 \pm 0,2$  mN mm<sup>-1</sup>.

Os animais do grupo Ct30, apresentaram um aumento constante em seus valores de CBC a partir de 24 bpm, em relação aos valores iniciais a 12 bpm (**Fig. 13B**). Em relação aos valores obtidos a 12 bpm, o grupo NPE30 exibiu um aumento progressivo dos valores de CBC a partir 36 bpm. Os girinos expostos (NPE30), apresentaram valores significativamente inferiores (82%) de CBC quando comparado ao grupo Ct30 em todas as frequências (12 a 120 bpm). Na frequência basal de *A. catesbeiana* (~72 bpm), o grupo Ct30 exibiu uma CBC média de  $291 \pm 48$  mN mm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>, enquanto o grupo exposto NPE30 apresentou um valor de  $55 \pm 11$  mN mm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>.

Em relação a taxa de contração, ambos os grupos experimentais não exibiram diferenças ao longo das frequências de estimulação, em comparação aos seus valores iniciais registrados a 0,2 Hz (**Fig. 13C**). O grupo NPE30 apresentou valores da taxa de contração significativamente inferiores (59%) ao grupo Ct30 em todas as frequências de estimulação elétrica analisadas (0,2 a 2,0 Hz). Na frequência fisiológica de 1,2 Hz, o grupo Ct30 exibiu uma taxa de contração de  $0,040 \pm 0,005$  mN mm<sup>-2</sup> ms<sup>-1</sup>, enquanto o grupo NPE30 apresentou uma taxa de  $0,016 \pm 0,002$  mN mm<sup>-2</sup> ms<sup>-1</sup>.

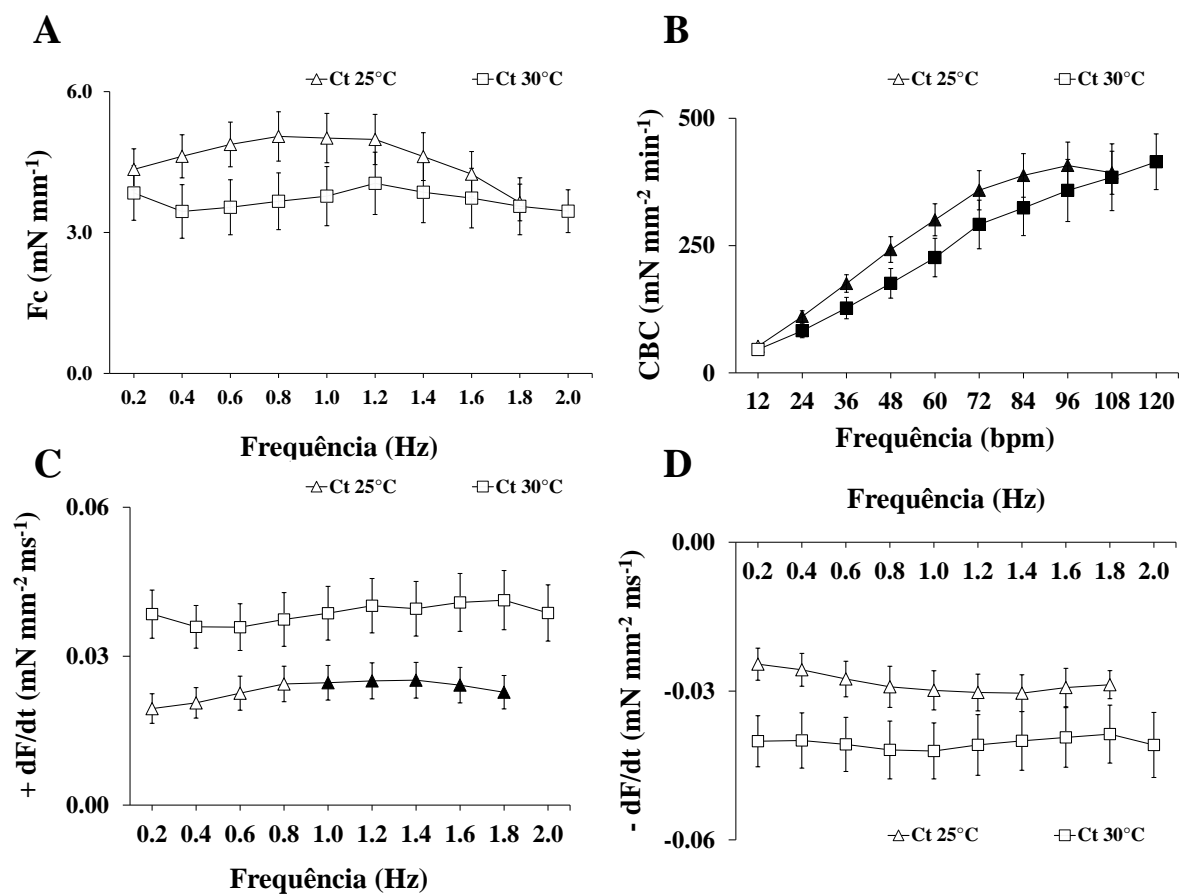
De forma similar, a taxa de relaxamento dos animais dos grupos experimentais Ct30 e NPE30, apresentaram valores contantes ao longo dos incrementos de estimulação, sem alteração em relação aos seus valores iniciais detectados a 0,2 Hz (**Fig. 13D**). O grupo NPE30, exibiu valores significativamente menores (59%) da taxa de relaxamento quando comparado ao grupo Ct30, em todas as frequências de estimulação (0,2 a 2,0 Hz). Na frequência fisiológica da espécie, a taxa de relaxamento do grupo Ct30 foi  $-0,041 \pm 0,006$  mN mm<sup>-2</sup> ms<sup>-1</sup>, enquanto no grupo NPE30 foi  $-0,016 \pm 0,002$  mN mm<sup>-2</sup> ms<sup>-1</sup>.

**Figura 13.** (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *Aquarana catesbeiana* mantidos a 30°C no grupo controle (Ct30, n=12) e no grupo exposto (NPE30, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 2,0 Hz). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Símbolos fechados indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos a 0,2 Hz (12 bpm) no mesmo grupo. Setas indicam a  $f_H$  registradas para o grupo controle (preta) e exposto (vermelha). (\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na mesma frequência entre os grupos experimentais Ct30 e NPE30.



A temperatura não alterou nenhum parâmetro de contratilidade ventricular quando comparado os dois grupos controle, CT25 e CT30, não havendo diferenças significativas em nenhuma frequência de estimulação nos parâmetros Fc, CBC e taxas de contração e relaxamento (**Fig. 14**).

**Figura 14.** (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos controles mantidos a 25°C e 30°C (Ct25, n=12; Ct30, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 2,0 Hz). Valores expressos em média ± E.P.M. Símbolos fechados indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos a 0,2 Hz (12 bpm) no mesmo grupo.



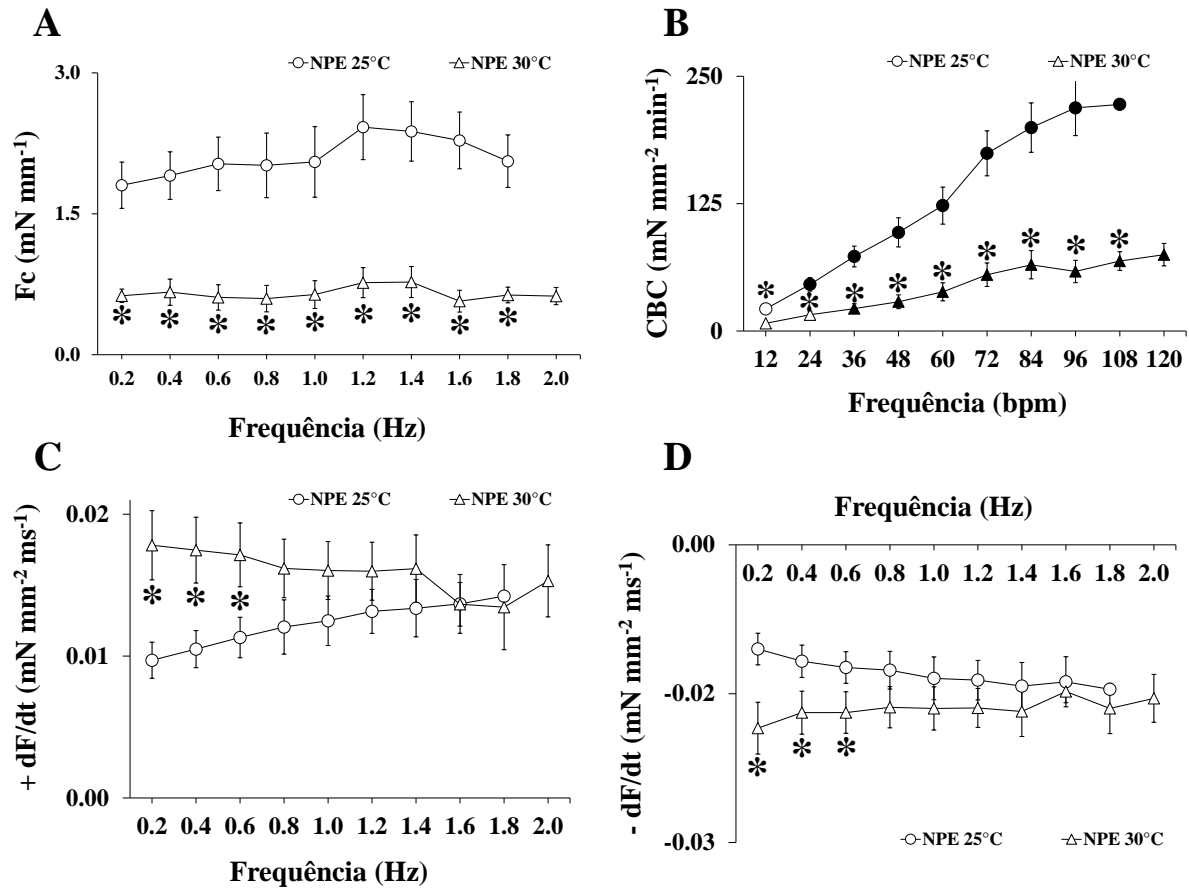
A **Fig. 15** apresenta a comparação dos parâmetros de contratilidade dos animais expostos ao NPE nas duas faixas de temperatura avaliadas: 25°C e 30°C.

A Fc do grupo mantido na temperatura mais elevada, NPE30, exibiu valores significativamente inferiores (69%) em relação a Fc do grupo exposto a 25°C, NPE25, de 0,2 a 1,8 Hz (**Fig. 15A**). Adicionalmente, as preparações ventriculares dos animais do grupo NPE30 foram capazes de manter o AE-C até a frequência de estimulação de 2,0 Hz, enquanto no grupo NPE25, as contrações se mantiveram regulares até 1,8 Hz. Houve interação entre a temperatura e exposição ao NPE na Fc entre todas as frequências de estimulação ( $p = 0,006$ ), indicando que o desenvolvimento de Fc durante a exposição ao NPE é dependente da temperatura (**Tab. 2**).

Em relação ao índice de CBC de maneira correlata a Fc, o grupo NPE30 exibiu valores inferiores (69%) da CBC quando comparado a exposição a 25°C, entre as frequências de 12 a 108 bpm (**Fig. 15B**). De forma similar a Fc, também houve a interação entre a temperatura e exposição ao contaminante para o comportamento da CBC entre 12 a 108 bpm ( $p = 0,040$ ).

Em relação as taxas de contração e relaxamento, as preparações ventriculares dos animais mantidos a 30°C (NPE30) apresentaram valores superiores (30% e 28%, respectivamente) em relação ao grupo NPE25, entre 0,2 a 0,6 Hz (**Fig. 15C e 15D, respectivamente**). Houve interação entre os fatores temperatura e exposição ( $p > 0,0001$ ) na taxa de contração nas frequências analisadas, revelando que influxo de  $Ca^{2+}$  durante a exposição ao NPE é dependente da temperatura. Contudo, na taxa de relaxamento, não houve interação entre a temperatura e a exposição ao NPE (**Tab. 2**).

**Figura 15.** (A) Força isométrica (Fc), (B) capacidade de bombeamento cardíaco (CBC), (C) taxa de contração e (D) taxa de relaxamento desenvolvidas pelos ventrículos de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos expostos mantidos a 25°C e 30°C (NPE25, n=12; NPE30, n=12), após incrementos sucessivos na frequência de estimulação elétrica (0,2 a 2,0 Hz). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Símbolos fechados indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos a 0,2 Hz (12 bpm) no mesmo grupo. (\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na mesma frequência entre os grupos experimentais Ct25 e Ct30.



**Tabela 2.** Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* nos parâmetros de contratilidade ventricular Fc, CBC e taxas de contração (+ dF/dt) e relaxamento (- dF/dt) de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). Valores expressos em média ± E.P.M. (\*) indica diferença significativa entre o grupo exposto e controle na mesma temperatura. (#) indica diferença significativa em relação aos valores obtidos a 0,2 Hz no mesmo grupo. Valores destacados em negrito indicam interação entre os fatores (p < 0,05).

Parâmetros de contratilidade ventricular																	
		Fc (mN mm <sup>-1</sup> )				CBC (mN mm <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup> )				+dF / dT (mN mm <sup>-2</sup> ms <sup>-1</sup> )				- dF / dT (mN mm <sup>-2</sup> ms <sup>-1</sup> )			
Grupo	Hz	CT25	NPE25	CT30	NPE30	CT25	NPE25	CT30	NPE30	CT25	NPE25	CT30	NPE30	CT25	NPE25	CT30	NPE30
		0,2	4,3 ± 0,4	1,8 ± 0,2 *	3,8 ± 0,6	<b>0,63 ± 0,1 *</b>	52 ± 5	21 ± 3 *	46 ± 7	<b>7 ± 1*</b>	0,019 ± 0,003	0,010 ± 0,001 *	0,038 ± 0,005	<b>0,018 ± 0,002 *</b>	-0,025 ± 0,003	-0,011 ± 0,002 *	-0,040 ± 0,005
0,4	4,6 ± 0,5	1,9 ± 0,3 *	3,4 ± 0,6	<b>0,67 ± 0,1 *</b>	110 ± 11 #	45 ± 6 *#	82 ± 13 #	<b>16 ± 3 *</b>	0,021 ± 0,003	0,010 ± 0,002 *	0,036 ± 0,004	<b>0,017 ± 0,002 *</b>	-0,026 ± 0,003	-0,012 ± 0,002 *	-0,036 ± 0,005	-0,018 ± 0,002 *	
0,6	4,8 ± 0,5	2,0 ± 0,3 *	3,5 ± 0,6	<b>0,61 ± 0,1 *</b>	175 ± 17 #	73 ± 10 *#	127 ± 21 #	<b>21 ± 5 *#</b>	0,023 ± 0,003	0,011 ± 0,002 *	0,036 ± 0,005	<b>0,017 ± 0,002 *</b>	-0,028 ± 0,004	-0,012 ± 0,002 *	-0,038 ± 0,005	-0,018 ± 0,002 *	
0,8	5,0 ± 0,5	2,0 ± 0,3 *	3,6 ± 0,6	<b>0,60 ± 0,1 *</b>	242 ± 25 #	96 ± 16 *#	175 ± 29 #	<b>28 ± 7 *#</b>	0,024 ± 0,004	0,012 ± 0,002 *	0,037 ± 0,005	<b>0,016 ± 0,002 *</b>	-0,029 ± 0,004	-0,013 ± 0,002 *	-0,039 ± 0,005	-0,017 ± 0,002 *	
1,0	5,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4 *	3,7 ± 0,6	<b>0,64 ± 0,1 *</b>	300 ± 31 #	123 ± 22 *#	226 ± 37 #	<b>38 ± 9 *#</b>	0,025 ± 0,003 #	0,012 ± 0,002 *	0,039 ± 0,005	<b>0,016 ± 0,002 *</b>	-0,030 ± 0,004	-0,013 ± 0,003 *	-0,039 ± 0,005	-0,018 ± 0,002 *	
1,2	4,9 ± 0,5	2,4 ± 0,3 *	4,0 ± 0,7	<b>0,77 ± 0,2 *</b>	358 ± 38 #	174 ± 25 *#	291 ± 47 #	<b>55 ± 11 *#</b>	0,025 ± 0,004 #	0,013 ± 0,002 *	0,040 ± 0,005	<b>0,016 ± 0,002 *</b>	-0,030 ± 0,004	-0,014 ± 0,003 *	-0,041 ± 0,006	-0,018 ± 0,002 *	
1,4	4,6 ± 0,5	2,3 ± 0,3 *	3,8 ± 0,6	<b>0,77 ± 0,2 *</b>	387 ± 42 #	199 ± 26 *#	323 ± 54 #	<b>65 ± 13 *#</b>	0,025 ± 0,004 #	0,013 ± 0,002 *	0,040 ± 0,006	<b>0,016 ± 0,002 *</b>	-0,030 ± 0,004	-0,014 ± 0,003 *	-0,040 ± 0,006	-0,018 ± 0,002 *	
1,6	4,2 ± 0,5	2,2 ± 0,3 *	3,7 ± 0,6	<b>0,57 ± 0,1 *</b>	407 ± 46 #	219 ± 29 *#	358 ± 61 #	<b>58 ± 11 *#</b>	0,024 ± 0,004 #	0,014 ± 0,003	0,041 ± 0,006	<b>0,014 ± 0,003 *</b>	-0,029 ± 0,004	-0,014 ± 0,003 *	-0,039 ± 0,006	-0,015 ± 0,001 *	
1,8	3,6 ± 0,4	2,0 ± 0,3 *	3,5 ± 0,6	<b>0,64 ± 0,1 *</b>	393 ± 42 #	222 ± 30 *#	384 ± 65 #	<b>68 ± 9*#</b>	0,023 ± 0,003 #	0,014 ± 0,003	0,041 ± 0,006	<b>0,013 ± 0,003 *</b>	-0,029 ± 0,003	-0,015 ± 0,003	-0,038 ± 0,006	-0,018 ± 0,002 *	
Interação		<b>p = 0,006</b>				<b>p = 0,040</b>				<b>p &lt; 0,001</b>				p = 0,2537			

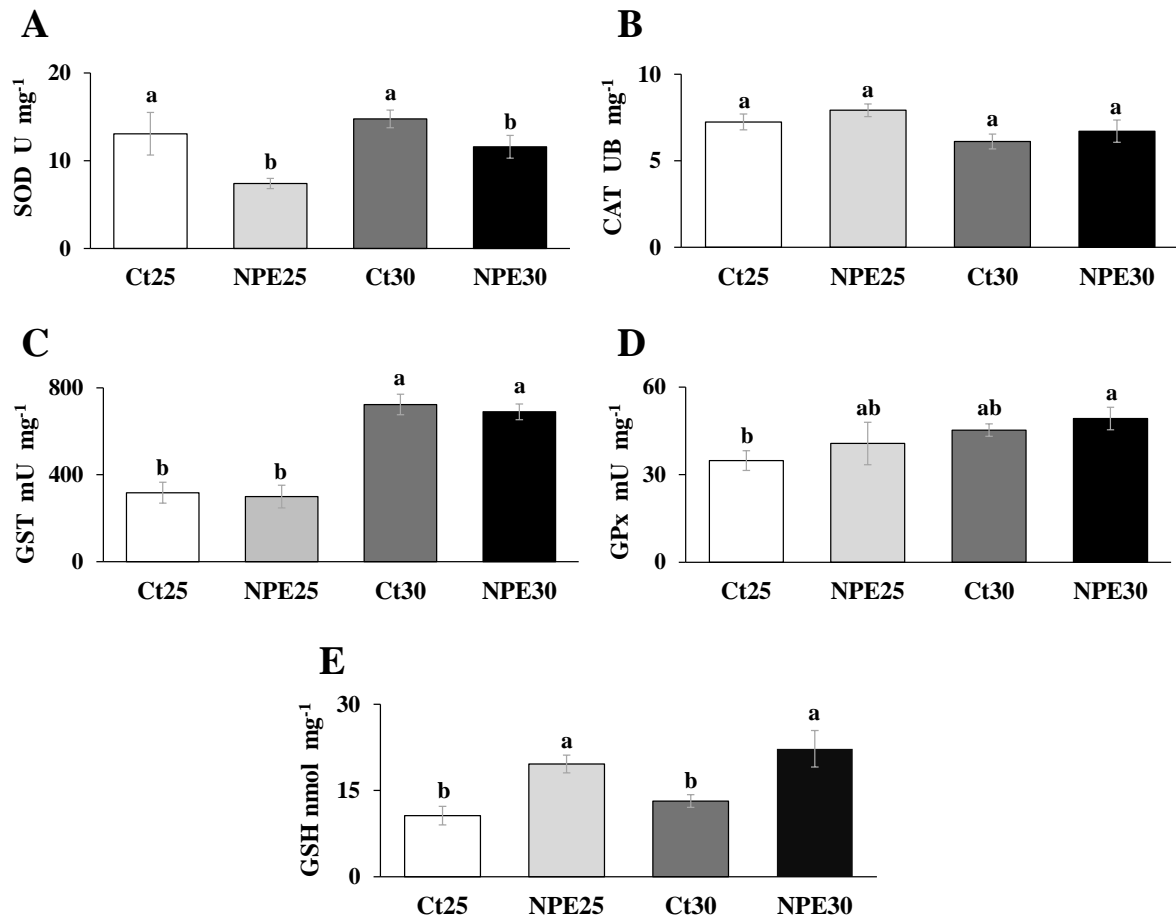
### **3.7 Biomarcadores bioquímicos**

No fígado, a exposição ao NPE resultou em diminuições significativas na atividade da SOD tanto a 25°C quanto a 30°C, (43% e 21%, respectivamente) (**Fig. 16A**). A atividade da CAT hepática não apresentou alterações após a exposição ao NPE em ambas as temperaturas (**Fig. 16B**).

A atividade da GST no fígado não apresentou alterações significativas em resposta à exposição ao NPE (**Fig. 16C**). No entanto, o aumento da temperatura resultou em elevações na atividade da GST nos grupos Ct30 e NPE30 (128% e 130%, respectivamente) em comparação com os valores correspondentes a 25°C. A atividade da GPx não foi alterada no tecido hepático após a exposição ao NPE, em ambas as temperaturas (**Fig. 16D**).

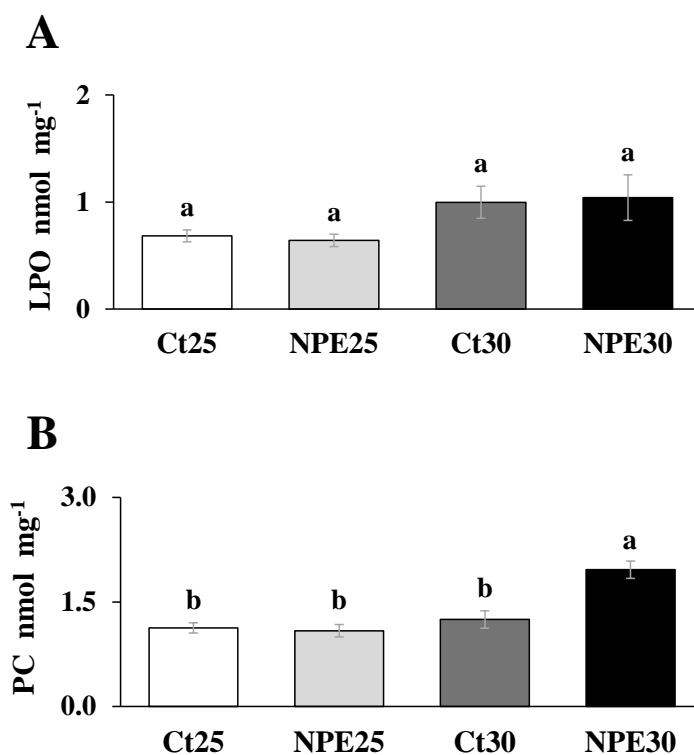
O conteúdo hepático de GSH aumentou (84% e 69%) após a exposição ao NPE em ambas as temperaturas de 25°C e 30°C, respectivamente (**Fig. 16E**). De modo geral, o comportamento dos biomarcadores enzimáticos frente a exposição ao NPE não demonstrou dependência da temperatura (**Tab. 3**) no fígado dos girinos, uma vez que interações entre os fatores temperatura e exposição não foram identificadas.

**Figura 16.** Atividade das enzimas **(A)** SOD, **(B)** CAT, **(C)** GST, **(D)** GPx e conteúdo de **(E)** GSH no fígado de girinos de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).



Em relação aos danos oxidativos, os níveis de LPO no tecido hepático não foram alterados pela exposição ao NPE (**Fig. 17A**) e não apresentaram interação entre a temperatura e a exposição ao NPE (**Tab. 3**). O conteúdo de PC hepática (**Fig. 17B**) não apresentou alterações significativas frente a exposição ao NPE a 25°C. No entanto, a 30°C, houve um aumento significativo (57%) nos níveis de PC com a exposição ao contaminante. Quando comparados os grupos expostos (NPE25 e NPE30), a temperatura mais elevada resultou em um incremento de 81% no conteúdo de PC evidenciando uma interação entre os estressores ( $p = 0,0258$ ). Esses resultados indicam que o estresse oxidativo do tecido hepático induzido pelo NPE é dependente da temperatura de exposição (**Tab. 3**).

**Figura 17.** Nível de (A) LPO e (B) PC no fígado de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).



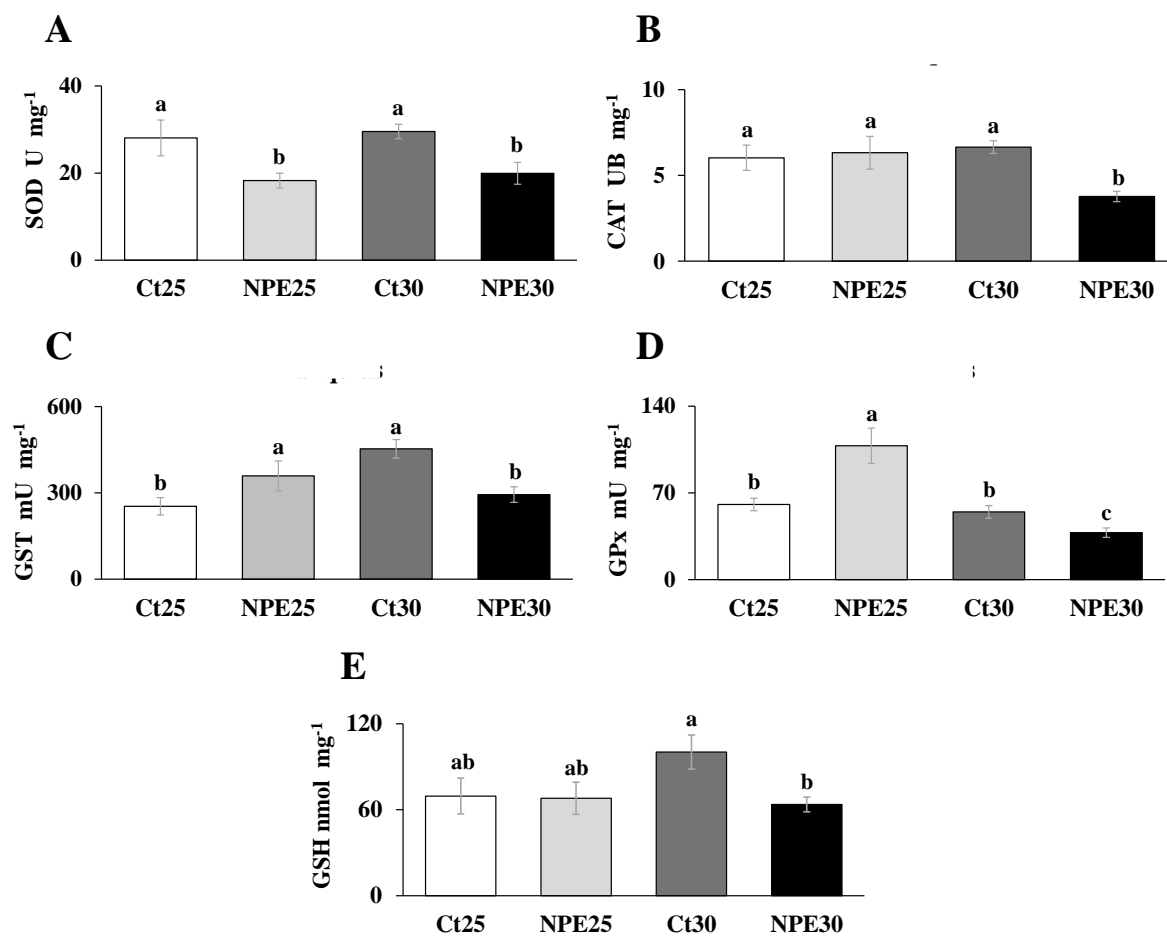
A exposição ao NPE reduziu (35% e 32%) a atividade da SOD branquial a 25°C e 30°C, respectivamente (**Fig. 18A**), sem a interação entre a temperatura e a exposição ao NPE (**Tab. 3**). A atividade da CAT não apresentou alterações frente a exposição a 25°C, porém foi reduzida (43%) na exposição ao NPE a 30°C (**Fig. 18B**). A atividade CAT no tecido respiratório demonstrou ser dependente da temperatura frente à exposição pelo NPE ( $p = 0,0105$ ).

A atividade GST nas brânquias aumentou (42%) a 25°C frente a exposição ao NPE,

porém a 30°C a exposição ao contaminante reduziu (35%) sua atividade (**Fig. 18C**). Em relação aos grupos controles, o CT30 apresentou um aumento (80%) na atividade da GST em comparação ao CT25. Houve a interação entre a contaminação pelo NPE e a temperatura ( $p < 0,0001$ ) para a atividade da GST. De forma similar, a GPx (**Fig. 18D**) apresentou um aumento (78%) em sua atividade após a exposição ao NPE a 25°C e uma redução (31%) quando exposta ao contaminante a 30°C, demonstrando a dependência da contaminação ao NPE com o aumento da temperatura ( $p = 0,0003$ ).

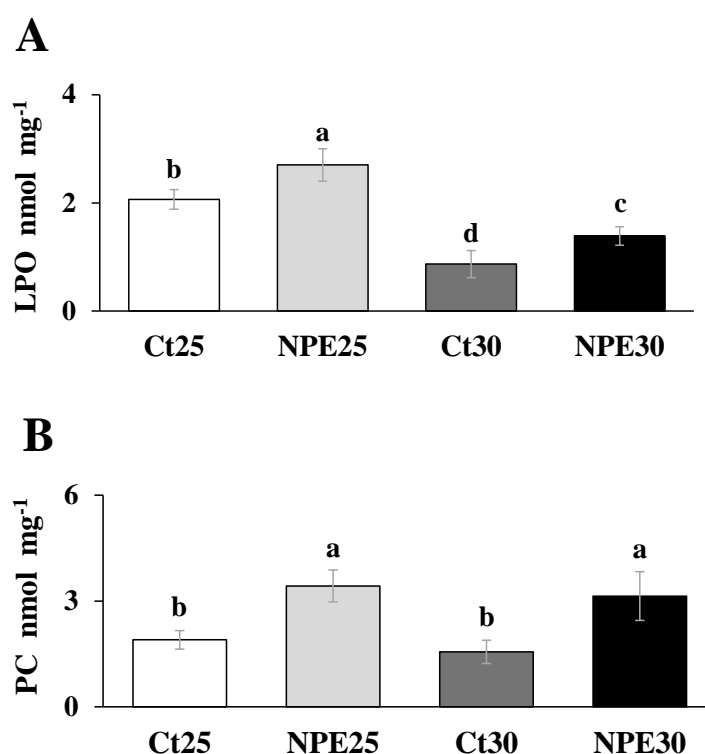
O conteúdo de GSH (**Fig. 18E**) do tecido branquial permaneceu inalterado com a exposição a 25°C, contudo a 30°C o NPE promoveu uma redução (37%) na concentração de GSH. A exposição ao NPE não demonstrou ser dependente da temperatura para o conteúdo de GSH branquial (**Tab. 3**).

**Figura 18.** Atividade das enzimas **(A)** SOD, **(B)** CAT, **(C)** GST, **(D)** GPx e conteúdo de **(E)** GSH das brânquias de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).



Em relação aos danos celulares nas brânquias promovidos por estresse oxidativo, os níveis de LPO (**Fig. 19A**) aumentaram significativamente (31% e 60%) em ambas as exposições ao NPE, a 25°C e 30°C respectivamente. Entretanto, apesar da LPO no grupo NPE30 ter sido mais reduzida (49%) em relação ao NPE25, não houve interação entre a exposição ao NPE e a temperatura (**Tab. 3**). Em relação ao conteúdo de PC nas brânquias (**Fig. 19B**), a exposição ao NPE a 25°C resultou em um aumento de 80% na carbonilação proteica em comparação ao grupo controle mantido na mesma faixa térmica. De forma similar, a 30°C, o NPE também induziu estresse oxidativo no tecido branquial, elevando em 101% a quantidade de PC em relação ao grupo controle correspondente. O incremento nos níveis de PC promovido pelo NPE não mostrou dependência da temperatura (**Tab. 3**).

**Figura 19.** Nível de (A) LPO e (B) PC nas brânquias de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



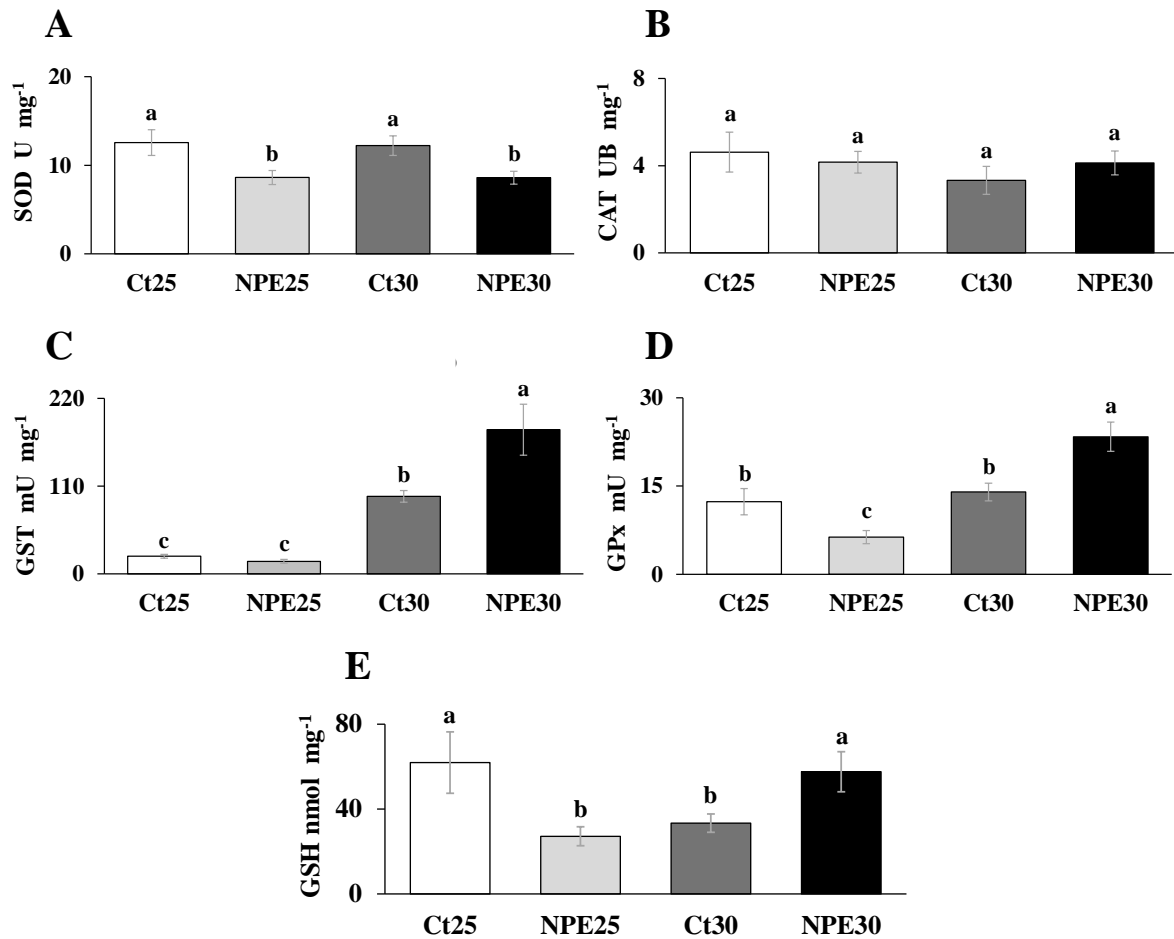
No tecido muscular, o NPE promoveu a redução (31% e 30%) da atividade enzimática da SOD (**Fig. 20A**) em ambas as temperaturas de 25°C e 30°C, respectivamente. A atividade da CAT (**Fig. 20B**), permaneceu inalterada com a exposição ao NPE nas duas faixas térmicas avaliadas. Em ambas as enzimas, SOD e CAT, não houve interação entre a exposição ao contaminante e a temperatura (**Tab. 3**).

Contudo, apesar da atividade da GST (**Fig. 20C**) não ter sido modificada com a

exposição a 25°C, na temperatura mais elevada o NPE promoveu o aumento (86%) da sua atividade no músculo, além da temperatura também indicar o aumento (338%) na atividade da GST no grupo CT30 em relação ao CT25 e entre os grupos expostos, o NPE30 exibiu um aumento exacerbado (1046%) em relação ao grupo NPE25. Evidenciando os efeitos da exposição ao NPE dependente da temperatura ( $p = 0,0056$ ) sobre a atividade da GST. A atividade da GPx (**Fig. 20D**) também foi comprometida no tecido muscular após a exposição ao NPE, apresentando uma redução (49%) a 25°C e um aumento (67%) em sua atividade a 30°C. Adicionalmente, quando comparado os grupos expostos, o NPE30 apresentou um aumento (270%) em relação ao grupo NPE25. Demonstrando que os efeitos da exposição ao NPE são dependentes da temperatura ( $p = 0,0002$ ) para essa enzima no músculo.

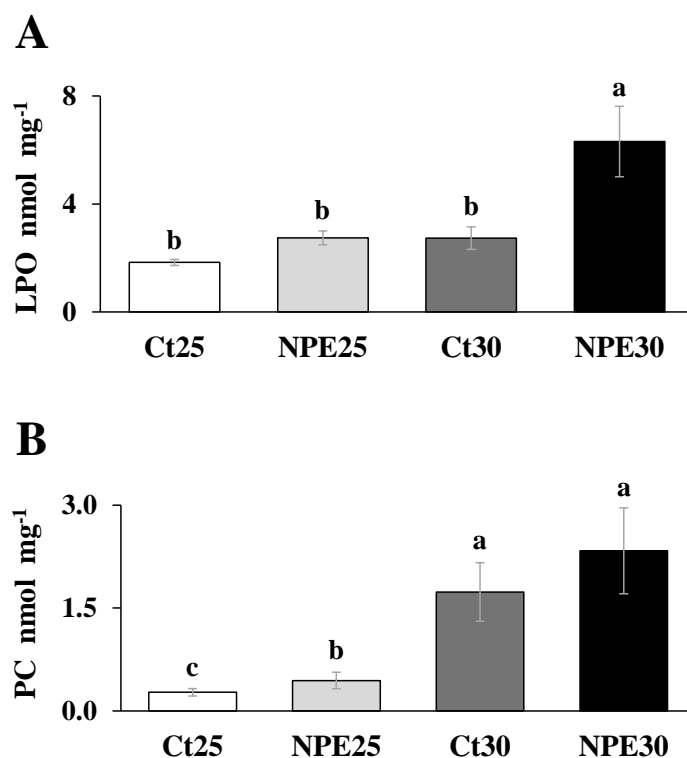
O conteúdo de GSH (**Fig. 20E**) foi alterado em ambas as exposições ao NPE, tendo uma redução (56%) a 25°C e um aumento (73%) em sua concentração a 30°C no tecido muscular. Além disso, a temperatura promoveu uma redução (46%) no conteúdo de GSH no grupo CT30 em relação ao grupo CT25 e comparando os dois grupos expostos, o NPE30 apresentou um aumento (112%) em relação ao NPE25. A interação ( $p = 0,0008$ ) entre a contaminação pelo NPE e o aumento da temperatura foi evidenciado nesse marcador do balanço redox muscular.

**Figura 20.** Atividade das enzimas **(A)** SOD, **(B)** CAT, **(C)** GST, **(D)** GPx e conteúdo de **(E)** GSH do músculo de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).



Em relação aos danos oxidativos, o nível de LPO (**Fig. 21A**) permaneceu inalterado após a exposição ao NPE a 25°C, entretanto houve um aumento (130%) da peroxidação de lipídeos a 30°C promovido pelo NPE em relação ao grupo controle na mesma faixa térmica. O grupo NPE30 comparado ao NPE25, apresentou um aumento (130%) na LPO, indicando a dependência da contaminação do NPE sobre a elevação de temperatura ( $p = 0,008$ ). Em relação aos níveis de PC muscular, a exposição ao NPE a 25°C resultou em um aumento de 63% em comparação ao grupo CT25 (**Fig. 21B**). Contudo a 30°C, o grupo NPE30 não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle mantido na mesma temperatura. O aumento na temperatura levou a um incremento considerável na quantidade de PC: o grupo CT30 apresentou um aumento de 538% em relação ao grupo CT25, e o grupo NPE30 teve um aumento de 428% em relação ao grupo NPE25. Não foi observada interação significativa entre a temperatura e a exposição ao NPE nos níveis de PC muscular (**Tab. 3**).

**Figura 21.** Nível de (A) LPO e (B) PC no músculo de *A. catesbeiana* dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 3.** Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* nos biomarcadores bioquímicos do fígado, brânquia e músculo de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). SOD (U mg<sup>-1</sup>), CAT (UB mg<sup>-1</sup>), GST (mU mg<sup>-1</sup>), GPx (mU mg<sup>-1</sup>), GSH (nmol mg<sup>-1</sup>), LPO (nmol mg<sup>-1</sup>) e PC (nmol mg<sup>-1</sup>). Valores médios ± EPM. (\*) indica diferença significativa (p < 0,05) entre o grupo exposto e controle na mesma temperatura. (#) indica diferença significativa (p < 0,05) entre temperaturas distintas, dentro do grupo controle ou exposto. Valores destacados em negrito indicam interação entre os fatores (p < 0,05).

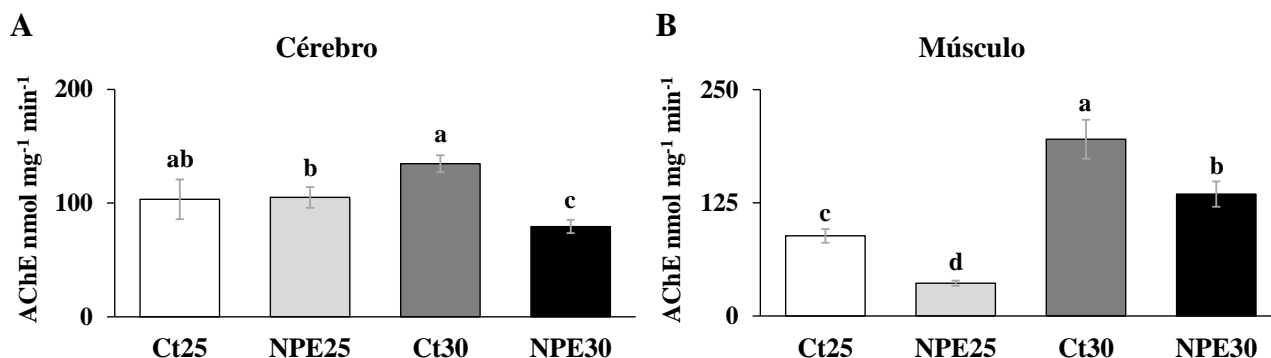
Órgão	Biomarcador	CT25	NPE25	CT30	NPE30	Interação
Fígado	SOD	13,1 ± 2,4	7,4 ± 0,6 *	14,8 ± 1,0	11,6 ± 1,3 *	0,4166
	CAT	7,2 ± 0,5	7,9 ± 0,4	6,1 ± 0,4	6,7 ± 0,6	0,9414
	GST	317,2 ± 48,1	299,6 ± 52,2	722,9 ± 47,2 #	689,3 ± 36,5 #	0,8574
	GPx	34,8 ± 3,4	40,7 ± 7,3	45,3 ± 2,2	49,2 ± 3,8	0,8188
	GSH	10,6 ± 1,6	19,6 ± 1,5 *	13,2 ± 1,1	22,3 ± 3,2 *	0,9770
	LPO	27,4 ± 3,0	30,7 ± 4,0	35,7 ± 4,5	36,0 ± 6,0	0,7704
	PC	1,12 ± 0,07	1,08 ± 0,09	1,24 ± 0,12	<b>1,96 ± 0,12 **</b>	<b>0,0258</b>
Brânquia	SOD	28,1 ± 4,1	18,3 ± 1,7 *	29,5 ± 1,7	20,0 ± 2,5 *	0,9648
	CAT	6,0 ± 0,7	6,3 ± 1,0	6,6 ± 0,4	<b>3,8 ± 0,3 **</b>	<b>0,0105</b>
	GST	235,5 ± 30,0	359,2 ± 52,2 *	453,1 ± 52,2 #	<b>293,9 ± 27,1 **</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	GPx	60,7 ± 5,1	108,1 ± 14,3 *	54,7 ± 5,0	<b>37,9 ± 3,8 **</b>	<b>0,0003</b>
	GSH	69,5 ± 12,5	68,0 ± 11,2	100,3 ± 11,9	63,6 ± 5,1 *	0,0928
	LPO	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,3 *	0,9 ± 0,3 #	1,4 ± 0,2 * #	0,7778
	PC	1,90 ± 0,26	3,42 ± 0,45 *	1,56 ± 0,32	3,14 ± 0,69 *	0,9467
Músculo	SOD	12,6 ± 1,5	8,6 ± 0,8 *	12,2 ± 1,1	8,6 ± 0,7 *	0,8926
	CAT	4,6 ± 0,9	4,2 ± 0,5	3,3 ± 0,6	4,1 ± 0,5	0,3061
	GST	22,2 ± 2,3	15,8 ± 2,5	97,2 ± 7,2 #	<b>180,8 ± 31,9 **</b>	<b>0,0056</b>
	GPx	12,3 ± 2,2	6,3 ± 1,1 *	14,0 ± 1,5	<b>23,4 ± 2,5 **</b>	<b>0,0002</b>
	GSH	61,9 ± 14,5	27,2 ± 4,5 *	33,4 ± 4,3 #	<b>57,6 ± 9,4 **</b>	<b>0,0008</b>
	LPO	1,8 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,4	<b>6,3 ± 1,3 **</b>	<b>0,0080</b>
	PC	0,27 ± 0,05	0,44 ± 0,12 *	1,73 ± 0,42 #	2,33 ± 0,62 #	0,6339

### 3.8 Biomarcadores neurotóxicos

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro dos animais expostos ao NPE a 25°C (NPE25) não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle mantido na mesma temperatura (Ct25) (**Fig. 22A**). Em contrapartida, a exposição ao NPE a 30°C (NPE30) resultou em uma redução significativa (41%) na atividade enzimática cerebral quando comparada ao controle correspondente a essa temperatura (Ct30). No grupo NPE30 houve a redução (24%) na atividade da AChE em relação ao grupo NPE25 e uma interação significativa ( $p = 0,0068$ ) entre a temperatura e a exposição ao NPE foi identificada na atividade da AChE encefálica.

Em relação a atividade da AChE muscular, o grupo NPE25 apresentou uma redução expressiva (59%) em comparação ao controle correspondente Ct25 (**Fig. 22B**). De modo similar, a exposição ao NPE a 30°C (NPE30) também causou uma diminuição (31%) na atividade da AChE quando comparado ao controle na mesma temperatura (Ct30). O grupo Ct30 demonstrou um aumento expressivo (121%) na atividade dessa enzima em relação ao controle Ct25. O grupo NPE30 apresentou um aumento (275%) na atividade da AChE muscular comparado ao NPE25, entretanto não houve a interação significativa entre os fatores exposição ao contaminante e temperatura (**Tab. 4**).

**Figura 22.** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no (A) cérebro e (B) músculo de girinos dos grupos controles (Ct25, n=12; Ct30, n=12) e expostos ao NPE (NPE25, n=12; NPE30, n=12) em duas temperaturas distintas: 25°C e 30°C. Valores expressos em média ± E.P.M. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 4.** Interação entre os fatores (NPE x temperatura) obtidos pela análise de variância ANOVA *two-way* na atividade da AChE (nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) no encéfalo e músculo de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos experimentais controles (CT25 e CT30) e expostos ao NPE (NPE25 e NPE30). Valores médios ± EPM. (\*) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo exposto e controle na mesma temperatura. (#) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre temperaturas distintas, dentro do grupo controle ou exposto. Valores destacados em negrito indicam interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ).

Tecido	CT25	NPE25	CT30	NPE30	Interação
<b>Encefálico</b>	103,3 ± 17,5	105,1 ± 9,1	134,7 ± 7,6	<b>79,4 ± 5,8 *#</b>	<b>0,0068</b>
<b>Muscular</b>	88,5 ± 7,6	36,1 ± 2,9 *	195,1 ± 21,5 #	134,7 ± 14,0 *#	0,7672

A exposição aguda (48 h) a uma concentração ambientalmente relevante ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) do NPE demonstrou promover uma série de efeitos tóxicos em diferentes sistemas biológicos de girinos de rã-touro, indicando a necessidade de maior atenção aos riscos associados à presença desse CE em ecossistemas aquáticos. Nos ensaios realizados, o NPE não apresentou uma alta degradação (~18%). A meia-vida de degradação primária do NPE em águas superficiais é de 4 dias (YOSHIMURA, 1986), indicando que, embora a degradação ocorra, ela não é suficientemente rápida para reduzir significativamente a concentração em um período de 48 h. Portanto, a proximidade entre as concentrações real e nominal durante os ensaios sugere que, a concentração do NPE manteve-se estável no sistema estático empregado neste estudo.

A exposição ao NPE promoveu efeitos hepatotóxicos (redução do IHS e estresse oxidativo), cardiotoxicos (redução da MVR, taquicardia, inotropismo e lusitropismo negativos), quebra na homeostase redox (alterações das atividades das enzimas antioxidantes e do conteúdo de antioxidante não enzimático) e indução ao estresse oxidativo (aumento nos níveis de LPO e PC) nos tecidos hepático, branquial e muscular. A neurotoxicidade foi observada pela diminuição da atividade da AChE, tanto central quanto periférica.

O estresse térmico potencializou os efeitos tóxicos do NPE sobre: a) a contratilidade miocárdica; b) o sistema de defesa antioxidante nas brânquias e no músculo; c) biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e no músculo; d) biomarcador de neurotoxicidade no encéfalo.

Esses resultados indicam que o padrão das respostas fisiológicas e bioquímicas frente a exposição ao NPE é dependente da temperatura, sugerindo um impacto potencialmente mais crítico para esses animais em ambientes contaminados diante do aquecimento das águas.

### **4.1 Alterações biométricas**

O fator K é um índice amplamente empregado em estudos ecotoxicológicos com animais aquáticos, buscando avaliar, o estado de saúde do organismo modelo com base em seu crescimento, considerando métricas como massa e comprimento corporal (PARANG; ESMAEILBEIGI, 2022; CRISTOPHE et al., 2015; KENNEDY et al., 2013). Esses indicadores refletem, de maneira integrada, o *status* energético dos organismos em resposta a estressores (BRODEUR et al., 2020; JAKOB et al., 1996). No presente estudo, o crescimento dos girinos de *Aquarana catesbeiana* manteve-se dentro da normalidade nos períodos de exposição de 48 h ao NPE e ao aumento da temperatura.

Um dos principais fatores que influencia o crescimento de anuros é a temperatura

ambiente, a qual impacta diretamente o metabolismo do animal (PETERSEN; GLEESON, 2011). Na fase larval nos estágios pré-metamórficos, a rã-touro prefere ambientes com temperaturas mais elevadas, variando entre 24°C e 28°C (WOLLMUTH; CRAWSHAW, 1988). Essa amplitude térmica favorece o aumento das taxas de desenvolvimento, contribuindo para um crescimento corporal mais expressivo e acelerando o início da metamorfose (HAMMOND et al., 2016). No entanto, conforme observado neste estudo, tanto a exposição ao NPE quanto o estresse térmico não aceleraram o metabolismo a ponto de alterar o crescimento dos animais. Esse resultado pode estar diretamente relacionado ao curto tempo da exposição aguda (48 h), que pode não ter sido suficiente para desencadear alterações metabólicas significativas ou impactos mais severos no desenvolvimento dos girinos. No entanto, é crucial considerar que, em condições de exposição crônica, onde os girinos são continuamente expostos ao NPE em corpos hídricos com temperaturas elevadas, os efeitos cumulativos desses estressores provavelmente resultarão em comprometimento do crescimento.

Adicionalmente, é importante destacar que os corpos d'água rasos, ambientes onde os girinos normalmente se desenvolvem (GRIFFITHS, 1997), são particularmente vulneráveis a variações bruscas de temperatura. Isso ocorre porque o menor volume de água nesses habitats reduz sua capacidade de amenizar mudanças térmicas, tornando-os mais suscetíveis a flutuações extremas de temperatura. Essas condições podem ser exacerbadas por fatores como a incidência solar direta, mudanças climáticas e atividades humanas, criando um cenário propício para o estresse térmico (JAMES et al., 1997; BRANS et al., 2018). Quando combinadas com a presença de contaminantes, como o NPE, essas variações térmicas podem amplificar os efeitos negativos sobre os anfíbios, especialmente durante sua fase reprodutiva (NOYES et al., 2009).

Por ser um contaminante, era esperado que o tecido hepático fosse um dos principais alvos do NPE, com possíveis impactos na homeostase desse órgão essencial para os processos de desintoxicação. Embora o fator K indique um crescimento normal dos animais, o estado do fígado também é um importante indicador do status de saúde do organismo (POPOVIĆ et al., 2023; HOOK et al., 2014). Neste estudo, o NPE provocou a redução na massa hepática, independentemente da faixa térmica.

Estudos anteriores com exposições ao nonilfenol e seus derivados etoxilados em modelos de anfíbios também reportaram efeitos similares sobre o tecido hepático. Por exemplo, Gregório et al. (2021) não identificaram alterações no IHS das larvas no estágio 25 de Gosner

de *A. catesbeiana* na exposição crônica (28 dias) em três concentrações de NP (1, 10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Entretanto, no trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, a exposição subcrônica (16 dias) ao NPE (30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) promoveu a redução do IHS em girinos de rã-touro no mesmo estágio de Gosner e dentro da faixa fisiológica da espécie (GONÇALVES et al., 2025). Adicionalmente, Bernabò et al. (2014) indicaram alterações hepato morfológicas na salamandra *Lissotriton italicus* após a exposição aguda (96 h) em duas concentrações (50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de NPE. Os autores destacaram degeneração nos hepatócitos, ampliação dos espaços intercelulares e acúmulo das grandes gotículas lipídicas. De forma similar, no peixe ciclídeo *Etroplus maculatus*, a exposição aguda ao NP em concentrações subletais (89 e 178  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por 96 h também resultou na redução da massa hepática (ASIFA; CHITRA, 2016). Dessa forma, esse CE é capaz de induzir efeitos degenerativos no tecido hepático, em exposições agudas, corroborando os resultados deste estudo.

Uma das razões que pode contribuir para a redução da massa hepática, é o aumento no número de apoptose de hepatócitos (BERNABÓ et al., 2014), sugerindo que o NPE talvez tenha ativado vias associadas à sinalização apoptótica, como a via da caspase-3, no tecido hepático dos girinos. A caspase-3 é ativada por via mitocondrial, após a liberação do citocromo c, e desempenha um papel central na sinalização apoptótica, devido a sua atividade proteolítica, (GREEN; KROEMER, 2004). Estudos prévios, como o de Paoletta et al. (2021), demonstraram que o NP (50 a 100  $\mu\text{M}$ ) é citotóxico para células hepáticas humanas, reduzindo parcialmente a proliferação celular e induzindo a morte celular programada. Os autores identificaram a caspase-3 como a principal via envolvida nesse processo. De forma semelhante, Bernabó et al. (2014) observaram um aumento na ativação da via da caspase-3, mediando a apoptose no fígado de salamandra *L. italicus* após exposição aguda ao NPE em baixas concentrações (50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Além disso, os autores sugeriram que o aumento do apoptose poderia estar associado ao estresse oxidativo induzido pelo NPE no tecido hepático. Dessa forma, a redução no IHS dos girinos expostos a 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE, em ambas as temperaturas testadas, possivelmente está relacionada à indução das vias de apoptose, seja pela ativação da caspase-3 e/ou pela indução de estresse oxidativo.

A redução do IHS impacta diretamente as reservas energéticas de girinos (SALLA et al., 2020). Segundo Prakash et al. (2022), as condições de estresse promovida por poluentes hídricos induzem o uso excessivo de reservas de energia frente ao aumento na demanda metabólica, comprometendo a massa hepática e reduzindo o IHS. Portanto, alterações na morfologia hepática podem comprometer a alocação de recursos energéticos essenciais para

atividades vitais, como natação, forrageamento, metamorfose e reprodução.

Os girinos expostos ao NPE também apresentaram redução da MVR, independentemente da temperatura. Os valores de MVR em vertebrados aquáticos, incluindo anfíbios, apresentam variações entre 0,04% e 0,2% (KLUTHE; HILLMAN, 2013). Os resultados obtidos no estudo estão em conformidade com essa faixa. Alterações degenerativas culminando na redução de tecido ventricular em anfíbios em resposta a exposição ao NPE, já foram documentadas em outros trabalhos. Por exemplo, Perrota e Tripepi (2012) demonstraram que a exposição aguda (96h) ao NPE ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) levou a danos ventriculares no coração de salamandra (*L. italicus*), caracterizados pela desorganização das fibras miocárdicas e ruptura das miofibrilas. Adicionalmente, foi evidenciado que a exposição subcrônica (16 dias) ao NPE ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em girinos de *A. catesbeiana*, promove a redução da massa ventricular acompanhada de redução na força de contração e de um efeito cronotrópico positivo (aumento na  $f_H$ ) como resposta compensatória para manter o débito cardíaco (GONÇALVES et al., 2025).

A diminuição da massa ventricular frequentemente resulta em uma redução no volume de sangue ejetado pelo coração (KEEN et al., 2017). Para compensar essa redução que impacta o débito cardíaco, o organismo pode adotar como estratégia adaptativa, o aumento da  $f_H$ , assegurando assim um fluxo sanguíneo adequado para perfusão tecidual e auxiliando os processos de desintoxicação (JONES-COSTA et al., 2018). Nesse contexto, os marcadores biométricos revelaram os efeitos subletais da exposição aguda ao NPE, os quais, embora não impactem diretamente o crescimento dos animais, geram complicações significativas na manutenção de dois órgãos vitais para a homeostase metabólica/desintoxicação e ajustes cardiovasculares.

Ademais, a exposição aguda ao NPE ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) induziu danos subletais no tecido hepático e cardíaco dos girinos de rã-touro, sem comprometer seu crescimento independentemente da variação de  $+5^\circ\text{C}$  na temperatura. A ausência de uma interação significativa entre os fatores NPE e temperatura, indica que o estresse térmico não modula as alterações nos índices biométricos frente a exposição aguda ao NPE. Isso sugere que a ruptura na homeostase do volume de sangue ejetado e a depleção dos estoques energéticos hepáticos ocorrem primariamente devido à toxicidade química do NPE. Isso reforça a relevância do NPE como um fator de estresse ambiental, com efeitos diretos sobre processos fisiológicos e órgãos vitais dos girinos, mesmo em níveis subletais. Embora a exposição aguda a concentrações ambientalmente relevantes de NPE não resulte em mortalidade, seus efeitos podem prejudicar a homeostase e comprometer a saúde dos organismos aquáticos.

## 4.2 Cardiotoxicidade

Segundo Driedzic e Gesser, (1994) a habilidade do músculo cardíaco em preservar o desempenho de bombeamento em diversas condições fisiológicas é uma característica essencial para a sobrevivência dos vertebrados basais. Dessa forma, ajustes eficazes na performance cardíaca em resposta à exposição a xenobióticos, através da manutenção do volume sistólico (VS) e/ou na  $f_H$ , torna-se essencial a sobrevivência da espécie.

A  $f_H$  *in loco* é uma análise interessante por permitir a obtenção de valores da frequência basal dos animais, além de evitar o estresse associado à técnica de implantação de eletrodos subcutâneos em animais vivos (WASSERSUG et al., 1981; BURGGREN et al., 1983). A taquicardia nos girinos de rã-touro induzida pelo NPE, foi observada independentemente da temperatura da água.

Os animais do grupo controle apresentaram uma  $f_H$  fisiológica de aproximadamente 70 bpm, corroborando dados de outros estudos em que a  $f_H$  de *A. catesbeiana* em estágios pré-metamórficos é reportada próxima a 70 bpm (JIA; BURGGREN, 2007; SALLA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2025). Por outro lado, os espécimes expostos ao contaminante apresentaram uma  $f_H$  média de cerca de 80 bpm, indicando que o NPE exerce um efeito cronotrópico positivo. Esse padrão de resposta é consistente com o observado em outros modelos expostos a contaminantes químicos tais como o herbicida Roundup e o pesticida Folisuper 600 e, a exposição subcrônica (16 dias) ao NPE (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2025), sugerindo uma ativação similar dos mecanismos cardiovasculares em resposta ao estresse de exposição.

A taquicardia após a exposição a xenobióticos, é explicado pela ativação de mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse, mediados principalmente pelo eixo neuroendócrino da adrenal e pelo sistema nervoso autônomo (HILLMAN et al., 2008; DENVER, 2009). A exposição a contaminantes ambientais, desencadeia a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) por ambas as vias, o que estimula a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no coração, resultando em uma taquicardia reflexa (STEE, 1978). Em anfíbios, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal leva ao aumento da secreção de corticosterona, hormônio que amplifica os efeitos das catecolaminas e modifica o direcionamento do fluxo sanguíneo (DENVER, 2009). Esse efeito está diretamente relacionado à necessidade de manutenção da homeostase cardiovascular e ao aumento da taxa metabólica, visando suprir a demanda energética elevada durante o estresse. Além disso, disruptores da via estrogênica, como o NP, tem sido sendo associados a modulações diretas na atividade adrenal

em mamíferos (CHANG et al., 2018; EGALINI et al., 2022). Um exemplo relevante é o estudo realizado em células medulares bovinas, no qual o NP e o bisfenol-A (BPA), em concentrações variando entre 0,1 e 10 nM, induziram um aumento significativo na expressão e liberação de catecolaminas (YANAGIHARA et al., 2005). Dessa forma, a taquicardia observada nos girinos expostos ao NPE pode não apenas representar uma resposta adaptativa ao estresse induzido pela exposição, mas também refletir a ação do NPE como um potencial disruptor endócrino, influenciando diretamente a modulação da atividade adrenal.

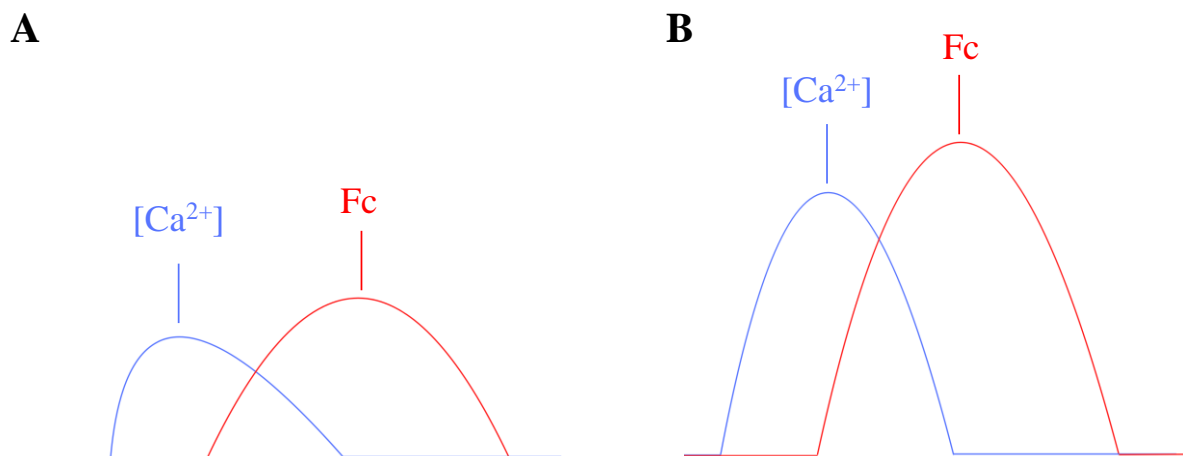
O débito cardíaco é o produto da  $f_H$  e pelo VS, sendo este último está diretamente relacionado a Fc e influenciado pela massa ventricular (HILLMAN 1976; WITHERS; HILLMAN, 2001; SALLA et al., 2015). Nos girinos expostos ao NPE, a diminuição da Fc ventricular pode ter sido compensada por um aumento na  $f_H$ , uma adaptação que visa preservar o débito cardíaco. Essa resposta também foi observada em girinos após a exposição subcrônica por 16 dias a mesma concentração de 30 ug L<sup>-1</sup> de NPE (GONÇALVES et al., 2025).

Embora exija um maior consumo de energia em comparação com o aumento do VS (COSTA et al., 2008), a estratégia de elevar a  $f_H$  ainda assegura que o coração bombeie um volume adequado de sangue por minuto. Durante o desenvolvimento larval, o metabolismo passa por ajustes significativos para sustentar o crescimento acelerado e a preparação para a metamorfose. A  $f_H$  basal tende a aumentar progressivamente à medida que o animal requer maior oxigenação e transporte de nutrientes para tecidos em rápida proliferação, como músculos e órgãos internos (HILLMAN et al., 2008). Os gastos energéticos são distribuídos entre a taxa metabólica basal, o crescimento somático, a atividade física e a maturação de sistemas que sofrem remodelação durante a transição para a vida terrestre (BURGGREN; PINDER, 1991). A eficiência na alocação de recursos energéticos, regulada por hormônios tireoidianos e corticosteroides, é crucial para o sucesso da metamorfose (DENVER, 2009), assegurando que as reservas sejam otimizadas para atender tanto às demandas imediatas quanto às futuras transformações morfofisiológicas. Entretanto, quando a  $f_H$  aumenta em resposta à exposição ao NPE, há um desvio significativo na alocação de energia, priorizando processos de resistência ao estresse em detrimento a maturação tecidual e o consequente atraso na metamorfose

Apesar do efeito cronotrópico positivo, a exposição aguda ao NPE promoveu um inotropismo negativo comprometendo o mecanismo de AE-C em girinos de *A. catesbeiana*, ao reduzir a Fc ventricular o que, por sua vez, diminuiu a eficiência do bombeamento cardíaco.

Como a Fc está diretamente relacionada às concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente nos cardiomiócitos (YUE 1987; GWATHMEY; MORGAN, 1991), o NPE pode ter impactado os mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  é o íon chave na contratilidade cardíaca, pois a elevação em sua concentração citoplasmática aumenta a interação com a subunidade da troponina C presente no complexo troponina-tropomiosina, ativando o evento de pontes cruzadas entre actina e miosina (BERNE et al., 2008). Com o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente, ocorre maior interação entre essas proteínas, resultando em uma contração mais forte (i. e. inotropismo positivo) (**Fig. 23**). Por outro lado, a redução na disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente diminui a ativação do sistema contrátil, enfraquecendo a contração e resultando no efeito inotrópico negativo (MACGOWAN; KORETSKY, 2000; BERNE et al., 2008)

**Figura 23.** Representação esquemática da relação entre a  $[\text{Ca}^{2+}]$  transiente e a geração da Fc. (A) estimulação elétrica do miocárdio resulta no aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  transiente intracelular e produção de Fc. (B) estímulo induzindo o aumento na amplitude do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e, conseqüentemente, o aumento da Fc do miocárdio.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

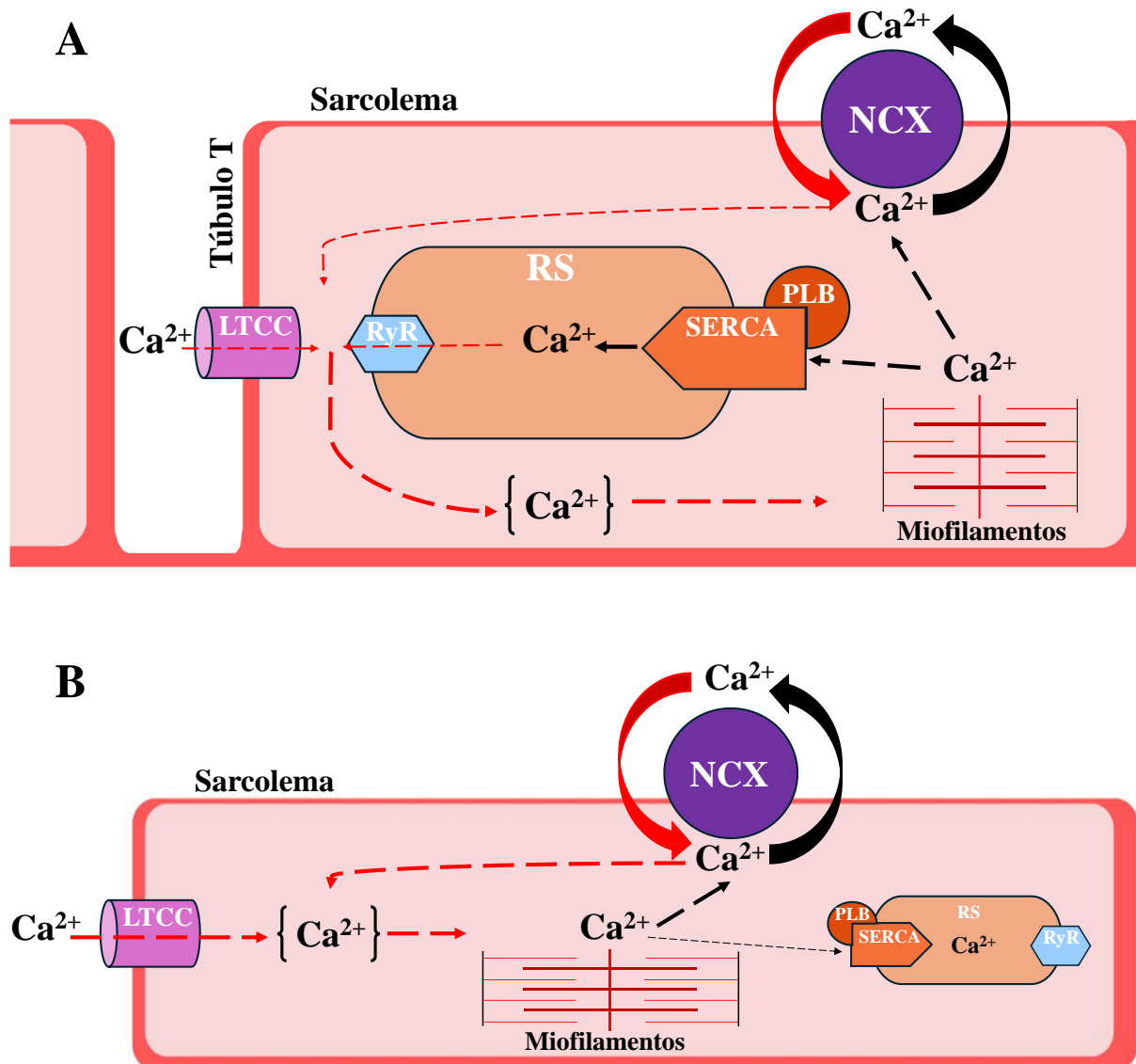
Cardiomiócitos de mamíferos e de vertebrados basais, como os anfíbios, compartilham similaridades no mecanismo do AE-C em relação a sequência de eventos, no qual a despolarização da sarcolema leva ao aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente, promovendo a contração (BERS, 2001; CERRA; IMBROGNO, 2012). Contudo, existem diferenças fisiológicas nos detalhes desse processo entre os grupos de vertebrados. Em mamíferos, o retículo sarcoplasmático (RS) desempenha o papel central como fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador, com a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ , mediada principalmente pelos canais de rianodina em resposta ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (LTCC) (BERS, 2001). Nos anfíbios, por outro lado, o RS contribui menos para o fornecimento de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador, sendo o influxo direto de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pelos transportadores sarcolemas (i. e., LTCC e trocador NCX) o principal

mecanismo de elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente durante a contração e a subsequente diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  para ocorrer o relaxamento (TIBBITS et al., 1991).

Adicionalmente, semelhante a outros vertebrados basais, os anfíbios não possuem o sistema de túbulos transversos (túbulos-T) (BOSSSEN; SOMMER, 1984; ABRAMOCHKIN et al., 2022), o que reflete uma organização celular distinta da observada em mamíferos. Essa diferença está intimamente relacionada às características morfofisiológicas dos cardiomiócitos. Em anfíbios, o comprimento longo (~300  $\mu\text{m}$ ) aliado ao estreito diâmetro (5  $\mu\text{m}$ ) do cardiomiócito resulta em um aumento expressivo da relação superfície/volume (SHIELS, 2022). Isso otimiza a eficiência das trocas entre os meios intra e extracelulares, assim como reduz a dependência de estoques citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Além disso, a organização interna dos cardiomiócitos de anfíbios apresenta miofibrilas concentradas predominantemente nas regiões periféricas, próximas à sarcolema, enquanto a região central é ocupada por organelas como mitocôndrias e núcleo. Essa disposição periférica das miofibrilas diminui drasticamente a distância de difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  para alcançar os miofilamentos contráteis, compensando a ausência de túbulos-T, que em mamíferos garantem a rápida propagação do potencial de ação para o interior da célula e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (SHIELS; GALLI, 2014).

**Figura 24.** Representação esquemática do AE-C em cardiomiócitos de (A) mamíferos e (B) vertebrados basais. Setas vermelhas indicam as vias de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente e as setas pretas indicam as vias de efluxo. Trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX); canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo lento (LTCC); retículo sarcoplasmático (RS); receptor de rianodina (RyR);  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA); fosfolambano (PLB).



Fontes: elaborado pelo autor.

Essas adaptações — diâmetro celular reduzido, alta relação superfície/volume e arranjo periférico das miofibrilas — sugerem que o RS desempenha um papel secundário na contratilidade cardíaca dos anfíbios. A menor dependência do RS está relacionada a baixa taxa metabólica basal e a menor demanda hemodinâmica desses animais, em comparação com os endotérmicos (i.e. mamíferos e aves) (BAŠKIERA; GVOŽDÍK, 2021). Isso reflete uma estratégia evolutiva distinta para equilibrar estrutura, função e gasto metabólico.

Embora a literatura sobre os efeitos do NP e seus etoxilados sobre a função cardíaca seja limitada, existem evidências que sugerem a influência de xenoestrogênicos sobre a atividade dos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  no coração indicando um possível caminho para a explicação das

alterações nos parâmetros de contratilidade ventricular. Lee et al. (2019), ao investigar os efeitos de dois disruptores endócrinos estrogênicos, octilfenol e BPA, sobre a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em células-tronco de camundongo em um ensaio crônico de 10 dias, identificaram a redução significativa nos níveis de mRNA do gene do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trpv2), acompanhada pela diminuição nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em cardiomiócitos de ratas, a exposição ao BPA prejudicou o manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, afetando especificamente os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (YAN et al., 2011). No caranguejo *Macrophthalmus japonicus*, o BPA e outros disruptores endócrinos também alteraram o manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  em células do hepatopâncreas, reduzindo a expressão de receptores de rianodina, um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  essencial do RS (KIN et al., 2024). Esses achados sugerem que essa classe de contaminantes químicos, que atuam na via estrogênica, impacta diversos canais relacionados ao manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  celular. No caso do NP, Liu et al. (2008) observaram que, em células cromafins adrenais bovinas, a exposição a 5  $\mu\text{M}$  de NP suprimiu a atividade de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. Em miócitos ventriculares de *guinea pig*, Gao et al. (2015) relataram que a exposição aguda ao NP, em concentrações de  $10^{-8}$  M e  $10^{-6}$  M, reduziu a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos canais LTCC, impactando a contratilidade miocárdica.

O coração, devido ao seu alto custo energético e dependência exclusiva do metabolismo aeróbico para a geração de ATP, apresenta uma alta densidade de mitocôndrias, atendendo à demanda contínua de energia para sustentar contrações rítmicas e ininterruptas (NEUBAUER 2007). Essa intensa atividade oxidativa resulta na produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são geradas principalmente pelo vazamento de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial durante a fosforilação oxidativa (PALMA et al., 2024). A constante síntese de ATP demanda uma elevada taxa de reações de oxirredução, o que aumenta a probabilidade de vazamento de elétrons que podem reagir com o  $\text{O}_2$  molecular, formando EROs como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (BALABAN et al., 2005). Esse vazamento pode ter sido amplificado pela exposição ao NPE. Estudos demonstram que o NP interfere na função mitocondrial, aumentando a produção de EROs e induzindo estresse oxidativo em diferentes tipos celulares (OKAI et al., 2004; GONG; HAN, 2006; MUKHERJEE et al., 2022). Por exemplo, as exposições crônicas (14 e 28 dias) ao NP ( $270 \text{ mg kg}^{-1}$ ) induziu à desregulação da cadeia transportadora de elétrons no sêrum de ratos, resultando em maior geração de EROs (KE et al., 2021). Portanto, o NPE, ao interferir na eficiência da fosforilação oxidativa, exacerba o vazamento de elétrons e aumentando a geração de EROs, consequentemente, contribui para danos celulares e teciduais.

O excesso de EROs pode interferir na contratilidade cardíaca por diversas vias como: a) oxidação por adição permanente de grupos carbonílicos em resíduos de cisteína dos filamentos contráteis, prejudicando o deslizamento acto-miosínico (CANTON et al., 2004); b) desequilíbrios na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , seja através da oxidação de proteínas envolvidas com as vias de manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente (TERENTYEV et al., 2008) ou pela peroxidação de lipídeos da sarcolema alterando a funcionalidade dos transportadores membranares (GONÇALVES et al., 2025), fundamentais principalmente para o AE-C em vertebrados basais; c) lesões no DNA mitocondrial (WALLACE, 2005) reduzindo a produção de ATP e, conseqüentemente, limitando a energia disponível para o ciclo de pontes cruzadas.

Em vertebrados com baixo metabolismo, como os anfíbios, a produção de EROs é naturalmente reduzida em comparação a organismos endotérmicos, devido ao metabolismo mais lento e menor densidade mitocondrial. No entanto, mesmo nesses organismos, a manutenção de uma regulação fina do sistema antioxidante é essencial, uma vez que o desequilíbrio redox representa um dos primeiros indicadores de toxicidade em resposta à exposição a xenobióticos (SILVESTRE, 2020). Diante disso, a discussão sobre a redução dos parâmetros ventriculares deve considerar não apenas aspectos eletromecânicos, mas também a bioquímica redox subjacente ao tecido cardíaco. Isso é respaldado por estudo anterior realizado em nosso laboratório, que demonstrou que a exposição subcrônica a  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de NPE causou estresse oxidativo caracterizado por níveis elevados de peroxidação de lipídeos no tecido ventricular (GONÇALVES et al., 2025). Esse mecanismo sugere que o NPE, ao comprometer a integridade das membranas celulares e a função mitocondrial, podendo prejudicar tanto a contratilidade, quanto o relaxamento cardíaco. Neste estudo, os biomarcadores de estresse oxidativo no ventrículo não foram avaliados. No entanto, a manutenção da Fc constante durante os incrementos na estimulação elétrica, aliada à taquicardia induzida pela exposição ao NPE, sugere uma alta demanda energética enfrentada pelos girinos, possivelmente resultando na maior produção de EROs.

A redução significativa na Fc e CBC também pode ser parcialmente atribuída à capacidade do NPE de induzir degeneração das fibras cardíacas (PERROTTA; TRIPEPI, 2012), conforme evidenciado pela redução MVR. Tal alteração morfológica pode contribuir para o efeito inotrópico negativo identificado em girinos de rã-touro expostos ao NPE. Um ventrículo com comprometimento estrutural, não será capaz de gerar a mesma Fc que um ventrículo saudável.

Tanto os efeitos inotrópicos quanto lusitropicos negativos observados em resposta à

exposição ao NPE podem também ser decorrentes, em parte, das modulações na expressão proteica e/ou funcionais no trocador sódio-cálcio (NCX), principal mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  em vertebrados basais. O NCX desempenha um papel fundamental nos cardiomiócitos dos vertebrados, mediando tanto o influxo (modo reverso) quanto o efluxo (modo normal) de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio da troca de 3 íons  $\text{Na}^+$  por 1 íon  $\text{Ca}^{2+}$  (BERS 2001).

O retardamento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode levar à dessincronização do AE-C, prolongando o intervalo entre o potencial de ação e a ativação mecânica, gerando contrações descoordenadas (i.e., arritmias) e dissociação eletromecânica, reduzindo a força de ejeção ventricular (LLACH et al., 2011). Em modelos experimentais utilizando o miocárdio ventricular de vertebrados basais, como o abordado neste estudo, a ausência de túbulos-T e a alta dependência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular podem tornar esse mecanismo ainda mais suscetível a atrasos no influxo deste íon.

De maneira similar, o atraso no efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, mediado principalmente pelo NCX operando em seu modo normal e pelas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases sarcolemais em animais ectotérmicos (BERS, 2001), compromete o relaxamento ventricular, prolongando a diástole e reduzindo a eficiência do preenchimento ventricular para a próxima contração. Essa falha mecanicista leva ao acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aumentando o risco de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e disfunções rítmicas (VASSALLE; LIN, 2004). Além disso, o desajuste entre os processos de relaxamento e contração prejudica a sincronização do ciclo cardíaco, impactando a CBC e, possivelmente, o débito cardíaco. A eficiência na função cardíaca é crucial para assegurar a adequada perfusão tecidual e o suprimento de  $\text{O}_2$ , elementos indispensáveis para o crescimento e a transição bem-sucedida para estágios mais avançados de desenvolvimento.

O aumento da temperatura acima da faixa térmica ideal para girinos de rã-touro causou uma redução significativa na Fc dos girinos expostos ao NPE, comprometendo a eficiência do bombeamento cardíaco, bem como a taxa de contração. O aumento térmico eleva a taxa metabólica basal (LONGHINI et al., 2021) e afeta a estabilidade dos miofilamentos e a sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (HARRISON; BERS, 1990), prejudicando diretamente a geração da Fc. Entretanto no grupo Ct a  $30^\circ\text{C}$ , a redução na Fc não foi observada. Isso sugere que o NPE pode estar exercendo uma ação diretamente sobre o canal LTCC. Em experimentos conduzidos por meio da técnica de *patch clamp* em cardiomiócitos isolados de *guinea pig*, foi observado uma redução significativa na corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  dos canais LTCC após a incubação com NP ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  M) (GAO et al., 2015). Isso sugere que o NPE pode modular o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado pelo LTCC, tendo impacto diretamente na amplitude de

Ca<sup>2+</sup> transiente e, conseqüentemente, na Fc.

Por outro lado, as taxas de contração e de relaxamento do grupo exposto ao NPE a 30°C foram maiores em relação a exposição a 25°C, em frequências subfisiológicas, indicando uma ciclagem de Ca<sup>2+</sup> mais rápida, mesmo diante de uma menor amplitude de Ca<sup>2+</sup> transiente. A atividade do trocador NCX demonstra sensibilidade as modificações redox mediadas pelas EROs (REEVES et al., 1986; KATO; KAKO, 1988). Em miócitos ventriculares isolados de ratos, a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou no aumento da atividade do NCX (KUSTER et al., 2010). De modo similar, a geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> aumentou significativamente tanto o influxo, quanto o efluxo de Ca<sup>2+</sup> mediados pelo NCX (ZIMA; BLATTER, 2006). Dessa forma, o possível desequilíbrio redox frente a exposição ao NPE pode ter contribuído para a maior ciclagem de Ca<sup>2+</sup> nessas frequências.

Fatores relacionados às propriedades passivas do coração, como o conteúdo e a composição do colágeno, também são significativamente alterados em resposta à aclimatação térmica (KEEN et al., 2016). A elevação na temperatura altera as propriedades viscoelásticas do tecido, diminuindo a contribuição relativa dos componentes viscoelásticos (tensões viscosas e elásticas) para a rigidez miofascial (MUTUNGI; RANATUNGA, 1998). Segundo Leikina et al., (2002) o aumento da temperatura desestabiliza a estrutura do colágeno tipo I (principal proteína da matriz extracelular), reduzindo a as ligações de hidrogênio entre cadeias polipeptídicas. Essa desnaturação térmica diminui a rigidez do tecido e facilita o deslizamento entre fibrilas de colágeno, corroborando com o mecanismo descrito acima por Mutungi e Ranatunga (1998). Essas mudanças nas propriedades passivas, desencadeadas por alterações na temperatura ambiental representam um desafio considerável para a manutenção da função cardíaca normal para animais ectotérmicos (KEEN et al., 2017).

Keen et al. (2016) avaliaram os efeitos da variação térmica na plasticidade de expressão de genes relacionados ao colágeno cardíaco em truta arco-íris. Na condição de temperatura mais elevada (18°C), observaram aumento na expressão de proteínas envolvidas na degradação de colágeno, acompanhado por uma diminuição na expressão de genes promotores de colágeno, marcadores hipertróficos e genes de crescimento muscular. Essas alterações influenciaram diretamente a rigidez ventricular da espécie. Embora a rigidez dos ventrículos de girinos de *A. catesbeiana* não tenha sido avaliada, possivelmente essa plasticidade seja semelhante entre a rigidez cardíaca de animais ectotérmicos, pode ter contribuído para a redução da performance cardíaca dos girinos expostos ao NPE a 30°C.

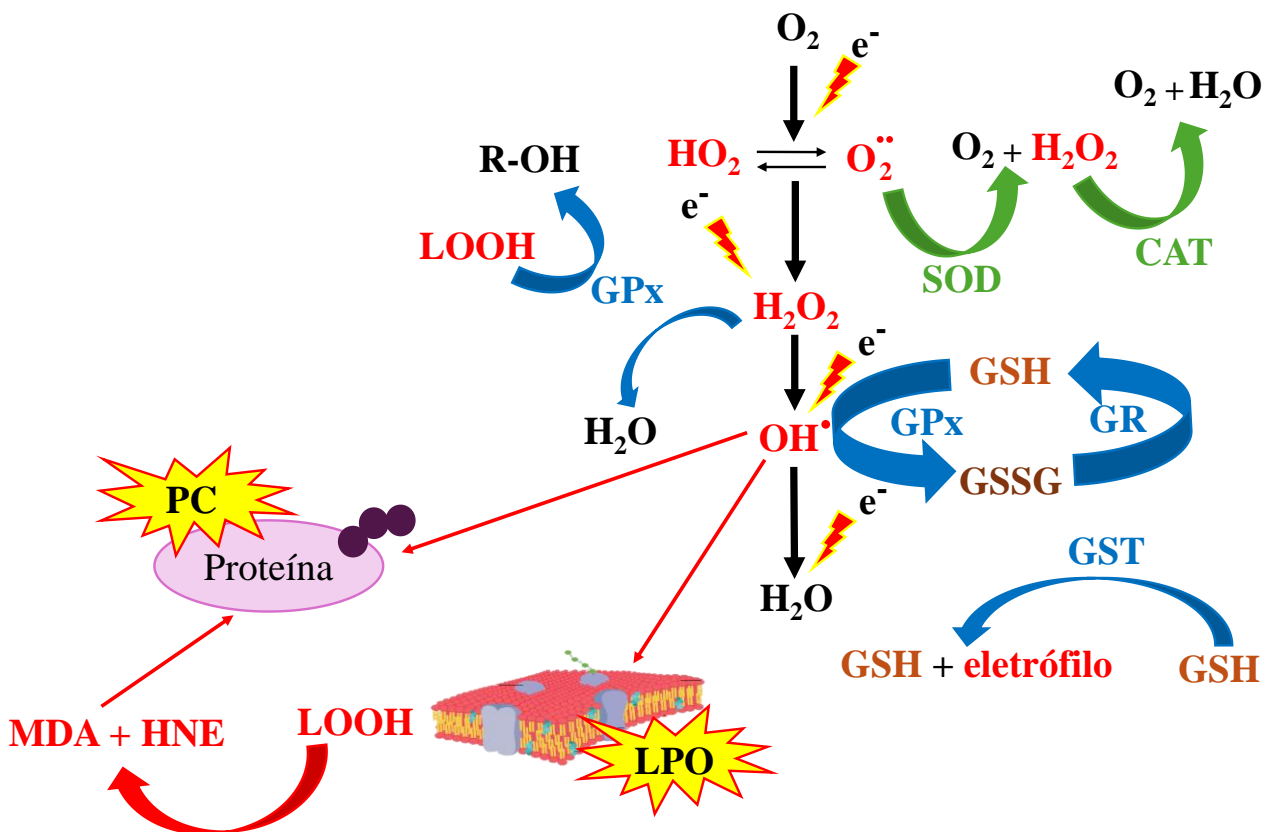
A interação significativa entre os fatores temperatura e exposição ao NPE revela um

efeito sinérgico desses estressores sobre a função cardíaca. Assim, o NPE exacerba os impactos cardiotoxicos em condições de estresse térmico, modulando os mecanismos envolvidos na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  transiente. Essa combinação compromete drasticamente a eficiência contrátil, limitando a capacidade do coração em manter a CBC necessária para atender às demandas metabólicas. Apesar do aumento compensatório da  $f_H$ , a ruptura da homeostase eletromecânica pela interação sinérgica entre um estressor físico (temperatura elevada) e um químico (exposição ao NPE), amplifica os danos à contratilidade, sublinhando a vulnerabilidade do tecido cardíaco de girinos a ambientes quimicamente contaminados sob o cenário atual de aquecimento global.

### ***1.2 Sistema antioxidantes e estresse oxidativo***

Como linha primária de defesa no controle do estresse oxidativo (YU, 1994), a atuação de forma integrada das enzimas SOD e CAT é essencial para proteger as células contra os danos causados pelas EROs. A SOD é responsável por catalisar a conversão do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , uma das EROs mais reativas, em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e  $\text{O}_2$  molecular. Em sequência, a CAT atua sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado pela ação da SOD, convertendo-o em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e  $\text{O}_2$ , prevenindo o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e diminuindo a formação de radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) (BARTOSZ, 2004). Dessa forma, a ação integrada dessas enzimas desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio redox e da integridade celular.

**Figura 25.** Esquema do sistema antioxidante; principais EROs e compostos reativos (em vermelho), vias antioxidantes enzimáticas (verde e azul), conteúdos antioxidantes não enzimáticos (marrom). Setas vermelhas indicam a interação entre compostos reativos e componentes celulares que podem levar a danos oxidativos. Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutiona-S-transferase (GST); glutiona peroxidase (GPx); glutiona reduzida (GSH); glutiona redutase (GR); glutiona oxidada (GSSG); oxigênio ( $O_2$ ); água ( $H_2O$ ); elétron ( $e^-$ ) ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ); hidroperoxila ( $HO_2$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ); proteína carbonilada (PC); lipoperoxidação (LPO); peróxido de lipídeo (LOOH); aldeídos reativos (MDA e HNE).



Fonte: elaborado pelo autor.

A SOD, demonstrou ser um biomarcador eficaz para avaliar os efeitos tóxicos do NPE em girinos de rã-touro, em decorrência da redução de sua atividade em todos os tecidos analisados, independentemente das temperaturas testadas, evidenciando o impacto do NPE na capacidade de defesa antioxidante contra os radicais  $O_2^{\bullet-}$ .

Em estudos utilizando cultura celular de hepatócitos de peixe (*Leiognathus klunzingeri*), Salamat e Derakhshesh (2020) relataram uma diminuição da atividade da SOD após 12 h de incubação com NP ( $2 \times 10^{-5}$  e  $3 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ ). Em embriões de *Danio rerio*, também foi constatada uma redução da atividade SOD após exposição aguda (12 h) ao NP em todas as concentrações (0,1, 1, 10, 100  $\mu g L^{-1}$ ) testadas (WU et al., 2011). De forma semelhante, no tecido branquial de *Oreochromis mossambicus*, a exposição a uma concentração subletal de NP (0,15 mg  $L^{-1}$ ) promoveu redução na atividade da SOD em todos os períodos de exposição

analisados (24, 96 h e 7 dias). Além disso, os autores ressaltaram as brânquias como excelentes biomarcadores para avaliar a toxicidade do NP, particularmente em relação ao estresse oxidativo (CHITRA; MOHAN, 2014). Os resultados obtidos em girinos, nos quais o tecido branquial foi o mais afetado no sistema antioxidante em função da exposição ao NPE, corroboram os achados dos estudos previamente citados.

Os efeitos do NP e seus etoxilados no tecido muscular são pouco descritos na literatura. Asifa e Chitra (2016) observaram que a exposição aguda ao NP (89 e 178  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por 24, 72 e 96 h resultou no aumento da atividade da SOD no músculo do ciclídeo *E. maculatus*. No entanto, nossos dados anteriores demonstraram que a concentração de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE induziu a redução da atividade da SOD no tecido muscular de girinos de rã-touro após a exposição subcrônica de 16 dias (GONÇALVES et al., 2025), de maneira semelhante aos resultados da exposição aguda, que também causaram diminuição da atividade da SOD, tanto a 25°C quanto a 30°C.

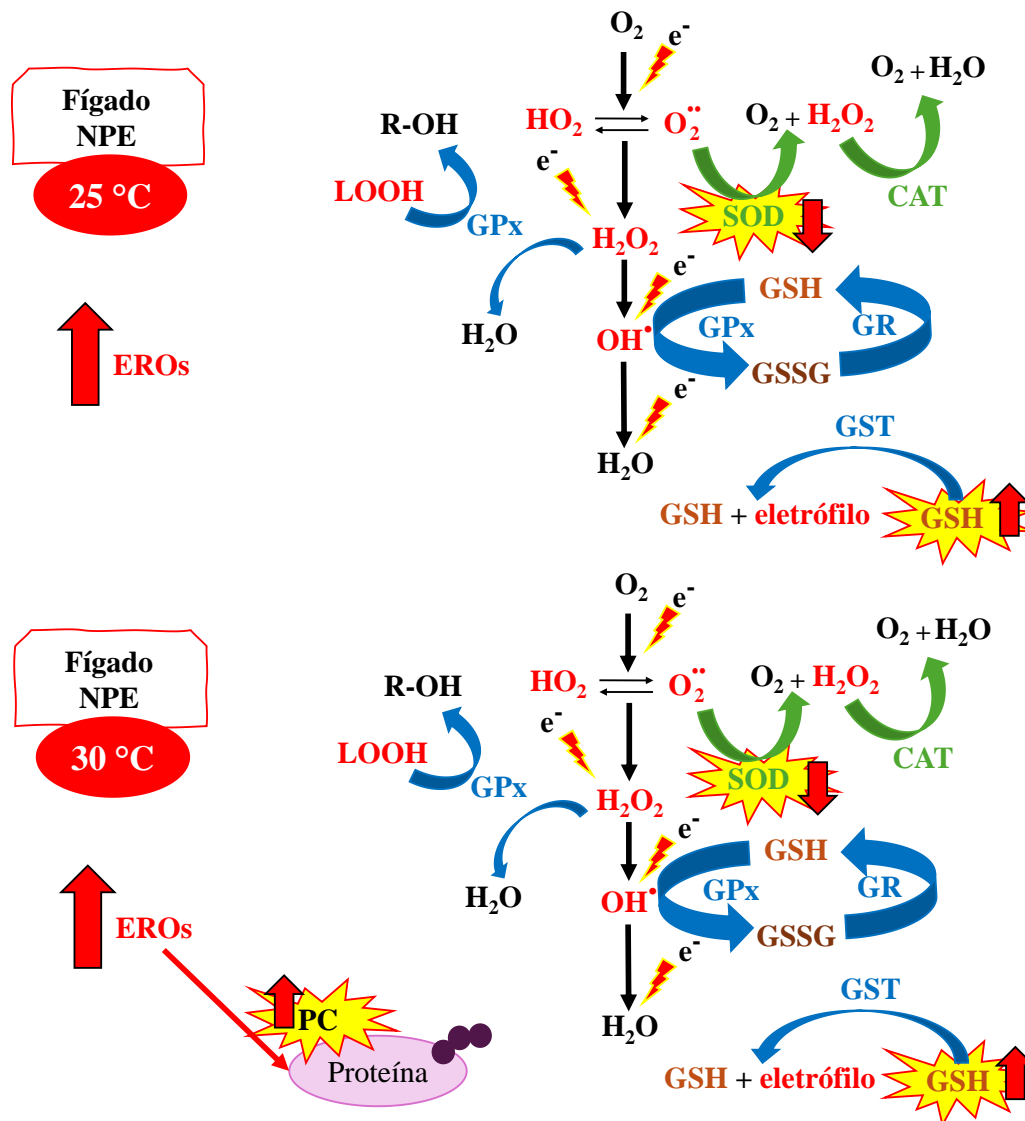
Em contrapartida, a atividade da CAT permaneceu inalterada após a exposição ao NPE na maioria dos tecidos. Apenas nas brânquias, a exposição ao NPE a 30°C causou redução da atividade da CAT. Esse efeito foi dependente da temperatura e pode ter sido decorrente do excesso de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . É conhecido que o acúmulo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , decorrente da redução da atividade da SOD, pode contribuir para a inativação da atividade da CAT (KONO; FRIDOVICH, 1982). Corroborando os resultados obtidos em girinos neste estudo, Chitra e Mohan (2014) demonstraram que a exposição ao NP promoveu a depleção da atividade da SOD, reduzindo concomitantemente a atividade da CAT em *O. mossambicus*. Esse feito foi atribuído ao acúmulo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que inibiu a atividade da CAT. Adicionalmente, os autores evidenciaram que tanto a exposição aguda quanto a crônica ao NP resultaram no aumento da produção de EROs, induzindo estresse oxidativo nas brânquias.

O estresse térmico resultou na redução da atividade da CAT nas brânquias, fígado e intestino da carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (DAWOOD et al., 2022). De maneira similar, em outra espécie de peixe (*Diplodus vulgaris*), observou-se a diminuição significativa na atividade catalítica da CAT muscular após o aumento da temperatura (MADEIRA et al., 2013). Topal et al. (2021) relataram que o estresse térmico induz alterações fisiológicas que reduzem os níveis de expressão do mRNA da CAT no encéfalo de peixes. Assim, o aumento na temperatura da água pode ter promovido alterações na expressão e/ou na atividade da CAT branquial em girinos.

O sistema da glutathiona desempenha um papel crucial na defesa antioxidante nas

células, no qual a GSH, um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina (MEISTER et al., 1983), é responsável pela neutralização das EROs por meio da doação de elétrons. Assim, a GSH atua protegendo componentes celulares, como lipídeos, proteínas e DNA, contra os danos oxidativos (WU et al., 2003). Esse sistema depende da atividade das enzimas GST e GPx para sua ação protetora. A GST promove a conjugação da GSH a xenobióticos eletrofílicos, aumentando sua solubilidade e facilitando sua excreção (HAYES; PULFORD, 2008). Por outro lado, a GPx catalisa a redução de peróxidos nocivos, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), utilizando a GSH como cofator, convertendo-os em água ou álcoois e oxidando a GSH à sua forma oxidada (GSSG) (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Em conjunto, esses componentes atuam sinergicamente para eliminar compostos prejudiciais, manter o equilíbrio redox e preservar a integridade celular. A desregulação desse sistema está associada a diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, destacando sua importância fundamental na homeostase celular e na prevenção de patologias (LU, 2013).

**Figura 26.** Efeitos da exposição ao NPE nas duas temperaturas (25°C e 30°C) sobre os sistemas antioxidantes e a indução do estresse oxidativo no fígado dos girinos. Destaques em amarelos representam redução (seta para baixo) ou aumento (seta para cima) nos biomarcadores bioquímicos. Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutationa-S-transferase (GST); glutationa peroxidase (GPx); glutationa reduzida (GSH); glutationa redutase (GR); glutationa oxidada (GSSG); oxigênio (O<sub>2</sub>); água (H<sub>2</sub>O); elétron (e<sup>-</sup>) ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>); hidroperoxila (HO<sub>2</sub>); peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); radical hidroxila (OH<sup>•</sup>); proteína carbonilada (PC).



Fonte: elaborado pelo autor.

Os girinos de rã-touro expostos ao contaminante NPE em ambas as temperaturas avaliadas exibiram um aumento significativo nos estoques hepáticos de GSH, sem alterações nas atividades das enzimas GST e GPx. Esses resultados sugerem uma preferência na utilização da GSH para a neutralização direta das EROs em detrimento da remoção de compostos prejudiciais mediada pelas atividades da GPx e da GST (FANG et al., 2002). O aumento do conteúdo da GSH pode ocorrer pela ativação de vias de sua síntese, como a *upregulation* da

glutamato-cisteína ligase (GCL) e glutathiona sintetase (GS), em resposta ao efeito pró-oxidante da exposição aguda do NPE. Nair et al. (2013) utilizando larvas de mosquito (*Chironomus riparius*) demonstraram o aumento significativo na expressão da GCL e GS, contribuindo para o aumento nos estoques de GSH, em três concentrações de NP (10, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) após 48 h de exposição ao contaminante. Na espécie chinesa de peixe, *Gobiocypris rarus*, a exposição por 7 dias ao BPA (225  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) levou ao aumento expressivo de 665% da GSH global, em relação aos peixes do grupo controle (YUAN et al., 2016). De forma similar, mas em algas (*Chlorella vulgaris*) a exposição aguda (24 h) ao NP (1  $\text{mg L}^{-1}$ ) aumentou os estoques de GSH, concomitantemente com o aumento na atividade da glutathiona redutase (GR) (GAO et al., 2011).

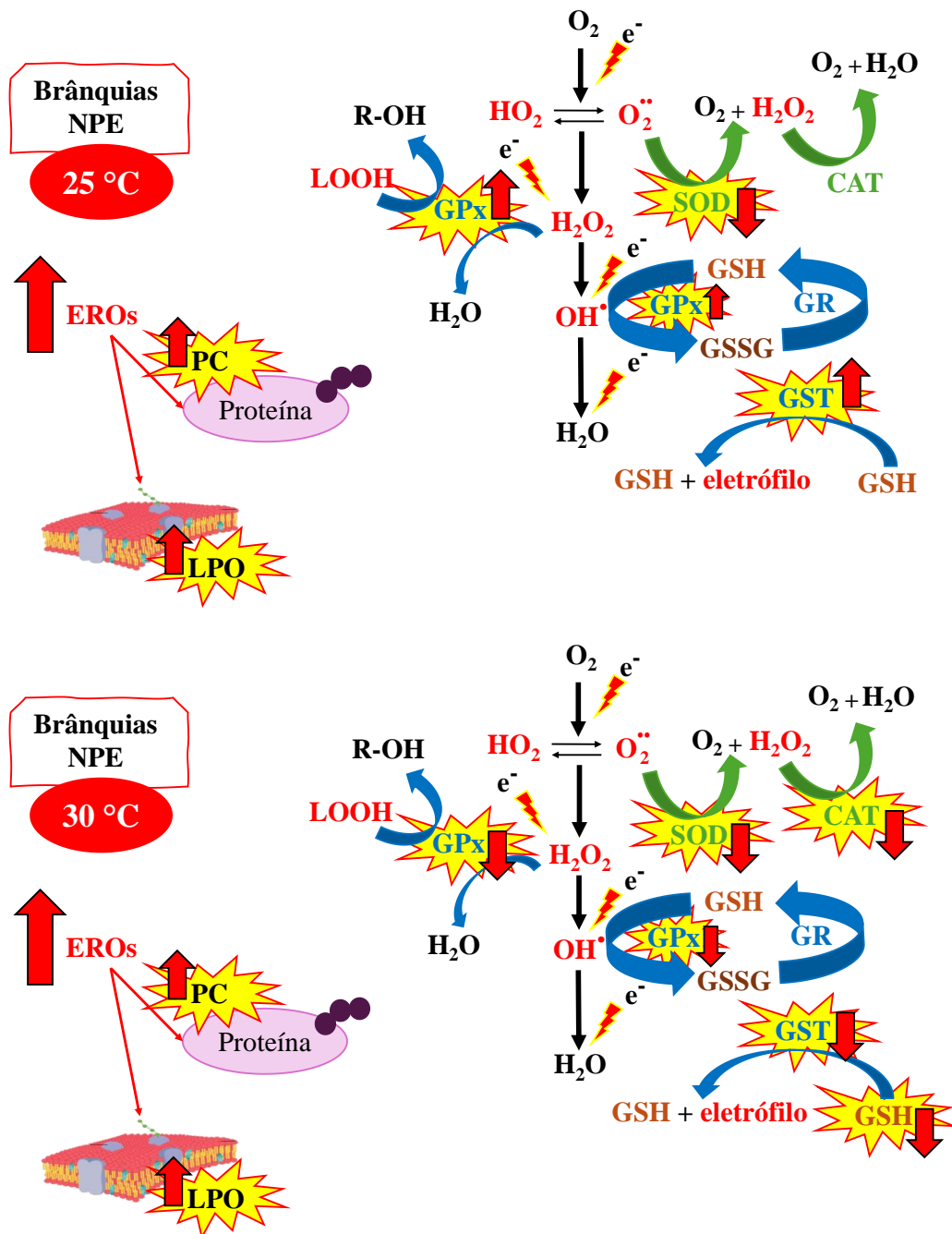
A glutathiona redutase (GR) é a enzima chave na manutenção dos níveis de GSH, uma vez que a GSH é convertida em sua forma oxidada (GSSG), seja por ação enzimática ou neutralização direta das EROs (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A GR catalisa a redução da GSSG em duas moléculas de GSH por meio do consumo de NADPH, o que assegura a manutenção da capacidade antioxidante celular. Assim, uma elevada razão GSH:GSSG é essencial para o funcionamento adequado das enzimas antioxidantes, a desintoxicação de xenobióticos e preservação do estado redox celular. Apesar da demanda energética neste processo, a alta eficácia na ciclagem de GSH pela GR pode ser uma das vias para o aumento dos estoques de GSH hepática observada nos girinos expostos ao NPE. Em embriões de zebrafish expostos (164 h pós fertilização) a 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de BPA, o aumento no conteúdo de GSH foi atribuído ao aumento da atividade da GR (WU et al., 2011). Embora a atividade da GR e os níveis de GSSG não tenham sido quantificados no presente estudo, esses fatores, juntamente com as alterações na biossíntese de GSH mediada por GCL/GS, podem ser uma explicação para o resultado observado no tecido hepático.

Outra hipótese a ser considerada é o aumento da concentração de GSH no fígado para suprir a depleção desse antioxidante em tecidos extra. Na exposição subcrônica (16 dias) a concentração de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NPE também induziu ao aumento na quantidade de GSH hepática nos girinos de rã-touro (GONÇALVES et al., 2025). Esse aumento pode ser interpretado como uma compensação sistêmica destinada a mitigar as deficiências de GSH em outros órgãos, como o tecido cardíaco, dado o papel central do fígado na regulação da homeostase interorgânica de GSH. A maior parte da GSH plasmática é sintetizada pelo tecido hepático, (LU, 2013). Portanto, as alterações nos níveis de GSH hepática podem ter implicações significativas na homeostase sistêmica desse tripeptídeo, afetando a capacidade antioxidante

global e a resposta ao estresse oxidativo em todo o organismo. Em contrapartida, no fígado de ratos expostos cronicamente ao NP ( $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) durante 50 dias via oral, houve uma redução significativa dos estoques hepáticos de GSH (KORKMAZ et al., 2009). Assim, esse mecanismo compensatório de elevação nos níveis de GSH pode ser interpretado como uma estratégia de proteção celular a curto prazo do tecido hepático contra os efeitos pró-oxidantes do NPE.

Nas brânquias, o aumento das atividades das enzimas GST e GPx sem alteração nos níveis de GSH indica uma tentativa do sistema antioxidante de neutralizar as EROs e os compostos eletrofílicos gerados pela exposição ao NPE a  $25^\circ\text{C}$ . A manutenção dos níveis de GSH branquial sugere que sua síntese/reciclagem está em equilíbrio com o consumo pelas atividades enzimáticas da GST e GPx. Adicionalmente, a manutenção dos níveis GSH nas brânquias dos girinos expostos ao NPE a  $25^\circ\text{C}$  pode ser atribuída ao suprimento hepático previamente discutido. Essa compensação sugere que o fígado pode estar mobilizando suas reservas de GSH para manter a homeostase do sistema antioxidante, mesmo diante das condições adversas impostas pela exposição ao contaminante.

**Figura 27.** Efeitos da exposição ao NPE nas duas temperaturas (25°C e 30°C) sobre os sistemas antioxidantes e a indução do estresse oxidativo nas brânquias dos girinos. Destaques em amarelos representam redução (seta para baixo) ou aumento (seta para cima) nos biomarcadores bioquímicos. Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutationa-S-transferase (GST); glutationa peroxidase (GPx); glutationa reduzida (GSH); glutationa redutase (GR); glutationa oxidada (GSSG); oxigênio (O<sub>2</sub>); água (H<sub>2</sub>O); elétron (e<sup>-</sup>) ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>); hidroperoxila (HO<sub>2</sub>); peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) e lipoperoxidação (LPO).



Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com Pickford et al. (2003), o NP penetra em peixes predominantemente através das brânquias e tegumento cutâneo. Em seus experimentos comparativos, a exposição

ao NP em concentrações de 1, 10 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  no meio aquático resultou em uma absorção aproximadamente dez vezes maior do que a ingestão via dieta em *Pimephales promelas*. O mecanismo de contracorrente branquial contribui significativamente para a eficiência do transporte de contaminantes da água para a corrente sanguínea (RAND, 1995). Com base nesses estudos, é possível inferir que as brânquias e a pele dos girinos expostos ao NPE apresentaram um contato mais intenso com o contaminante, o que os torna mais suscetíveis à intoxicação e aos efeitos pró-oxidantes do NPE.

A exposição por 10 dias ao NP em concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  induziu aumentos significativos das atividades da GST e da GPx no fígado do peixe dourada (*Sparus auratus*) (CARRERA et al., 2007). Em exposições agudas (12 e 24 h) ao NP, Parra-Guerra e Olivero-Verbel (2020) observaram o aumento na expressão dos genes *gpx-4* e *gpx-6* em larvas de *Caenorhabditis elegans* após 24 h de exposição ao NP (0,001  $\mu\text{M}$ ) e NPE (10  $\mu\text{M}$ ). Adicionalmente, nas brânquias da carpa *Labeo rohita* a atividade da GST foi elevada após exposições prolongadas (20, 40 e 60 dias) ao NP em todas as concentrações avaliadas (27, 36 e 54  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (KARMAKAR et al., 2021).

Corroborando com esses trabalhos, Vidal- Liñán et al. (2015) também demonstraram a indução na atividade da GPx e GST no tecido branquial de mexilhões, *Mytilus galloprovincialis*, após a exposição a 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NP após a exposição aguda (48 h) e crônica (20 a 40 dias). Portanto, esse padrão no aumento da atividade enzimática da GST e da GPx é observado em diferentes modelos experimentais, corroborando com os resultados observados nas brânquias de girinos expostos ao NPE a 25°C. Entretanto, os aumentos das atividades da GPx e GST, não foram suficientes para conter os danos oxidativos nas brânquias dos girinos expostos ao NPE a 25°C, avaliados pelos níveis de LPO e PC. Durante exposição subcrônica ao NPE por 16 dias, nenhuma alteração foi observada nas atividades da GST e da GPx nas brânquias de girinos de rã-touro (GONÇALVES et al., 2025).

Por outro lado, houve uma redução significativa tanto na atividade da GST quanto da GPx nas brânquias dos girinos expostos ao NPE a 30 °C, evidenciando uma interação entre a temperatura e a exposição ao NPE. Dessa forma, as condições térmicas podem potencializar os efeitos tóxicos do contaminante, comprometendo a capacidade antioxidante das brânquias. Os estoques de GSH das brânquias também apresentaram uma redução após a exposição ao NPE a 30°C, entretanto esse efeito não foi dependente do aumento da temperatura. Isso sugere que a diminuição nos níveis de GSH pode ser atribuída diretamente à toxicidade do NPE, independentemente das condições térmicas. Esses resultados sugerem um colapso do sistema antioxidante da glutathione sob estresse combinado, onde os efeitos negativos sinérgicos dos

estressores excederam a capacidade adaptativa das células branquiais, que foram eficientes durante a exposição a 25°C.

Embora não tenha sido observada uma interação entre os fatores NPE x temperatura sobre o conteúdo branquial de GSH, é provável que a diminuição do conteúdo de GSH tenha sido o fator responsável pela redução nas atividades enzimáticas da GST e GPx que são dependentes de GSH. O NPE pode ter atuado na via de síntese da GSH, reduzindo seu conteúdo nas brânquias. A falta de substrato para ação enzimática, juntamente com o estresse térmico atuando sobre a estrutura e funcionamento da GST e GPx, pode ter levado à inibição de suas atividades enzimáticas.

Na literatura, os efeitos do NP e seus etoxilados sobre a regulação na expressão das enzimas responsáveis pela biossíntese da GSH ainda são controversos. Conforme discutido anteriormente, o NPE poderia ter induzido o aumento dos estoques de GSH hepática. No entanto, o trabalho de Ke et al. (2021) avaliou a exposição crônica (28 dias) ao NP (270 mg kg<sup>-1</sup>) em ratos, com o objetivo de compreender como o contaminante afeta as vias de expressão de componentes antioxidantes. Os autores observaram que, após a exposição ao contaminante, houve uma redução na expressão do fator Nrf2 e um aumento na expressão da proteína Keap1 nos tecidos hepático e nervoso, tanto no citoplasma quanto no núcleo das células. O Nrf2 é um fator de transcrição que regula a expressão de genes antioxidantes. Quando ativado em resposta ao estresse oxidativo, se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) no DNA, induzindo a produção de enzimas antioxidantes como a GCL e GST (ITOH et al., 1997; BLOOM et al., 2002). Por sua vez, o Keap1 atua como sensor de estresse oxidativo no citoplasma, ligando-se ao Nrf2 em condições normais e promovendo sua degradação proteossômica (KOBAYASHI et al., 2004). Sob condições de estresse oxidativo, essa ligação Keap1-Nrf2 é interrompida, permitindo que o Nrf2 migre para o núcleo e ative a expressão de genes de defesa antioxidante.

Se o NPE inibir a via Keap1-Nrf2, isso pode comprometer a resposta antioxidante e a síntese de GSH nos girinos. Segundo Ke et al. (2021), a exposição a disruptores endócrinos inibe essa via, aumentando significativamente a expressão de Keap1, concomitantemente com a repressão na expressão de Nrf2, o que diminuiu a capacidade antioxidante. A GCL é uma enzima heterodimérica cuja subunidade catalítica (GCLC) é dependente da via do Nrf2 (BLOOM et al., 2002). Camundongos *knockouts* para Nrf2 demonstraram redução nos estoques de GSH (CHAN et al., 2001) e baixa expressão de GCLC (CHEN et al., 2003) hepáticas. Portanto, a ação do NPE na via do Nrf2 pode ter contribuído para a redução significativa nos estoques de GSH branquial a 30°C. Embora a GCLC seja frequentemente *up-regulated* para aumentar as defesas antioxidantes quando necessário, Lu (2013) ressalta que

em situações onde os danos oxidativos severos, a expressão da GCLC pode se tornar desregulada, levando a uma diminuição na síntese de GSH. Esse cenário pode ter contribuído para a redução dos níveis de GSH nas brânquias dos girinos expostos ao NPE a 30°C.

No fígado de *goldfish* (*Carassius auratus*), o aumento da temperatura de 21°C para 35°C resultou na redução da atividade da GPx após 1 h de estresse térmico (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). Em camarões *Litopenaeus vannamei* expostos a variações térmicas de 15°C para 22°C e 28°C, a expressão de GST e GPx no hepatopâncreas foi reduzida nas duas faixas térmicas mais elevadas, enquanto nas brânquias observou-se uma diminuição exclusiva da GPx em ambas as elevações de temperatura (ZHOU et al., 2010). Da mesma forma, no bagre *Heteropneustes fossilis*, o aumento térmico de 25°C para 37°C por 4 h promoveu a redução dos estoques de GSH branquial, concomitante à diminuição da atividade da GPx (PARIHAR et al., 1997).

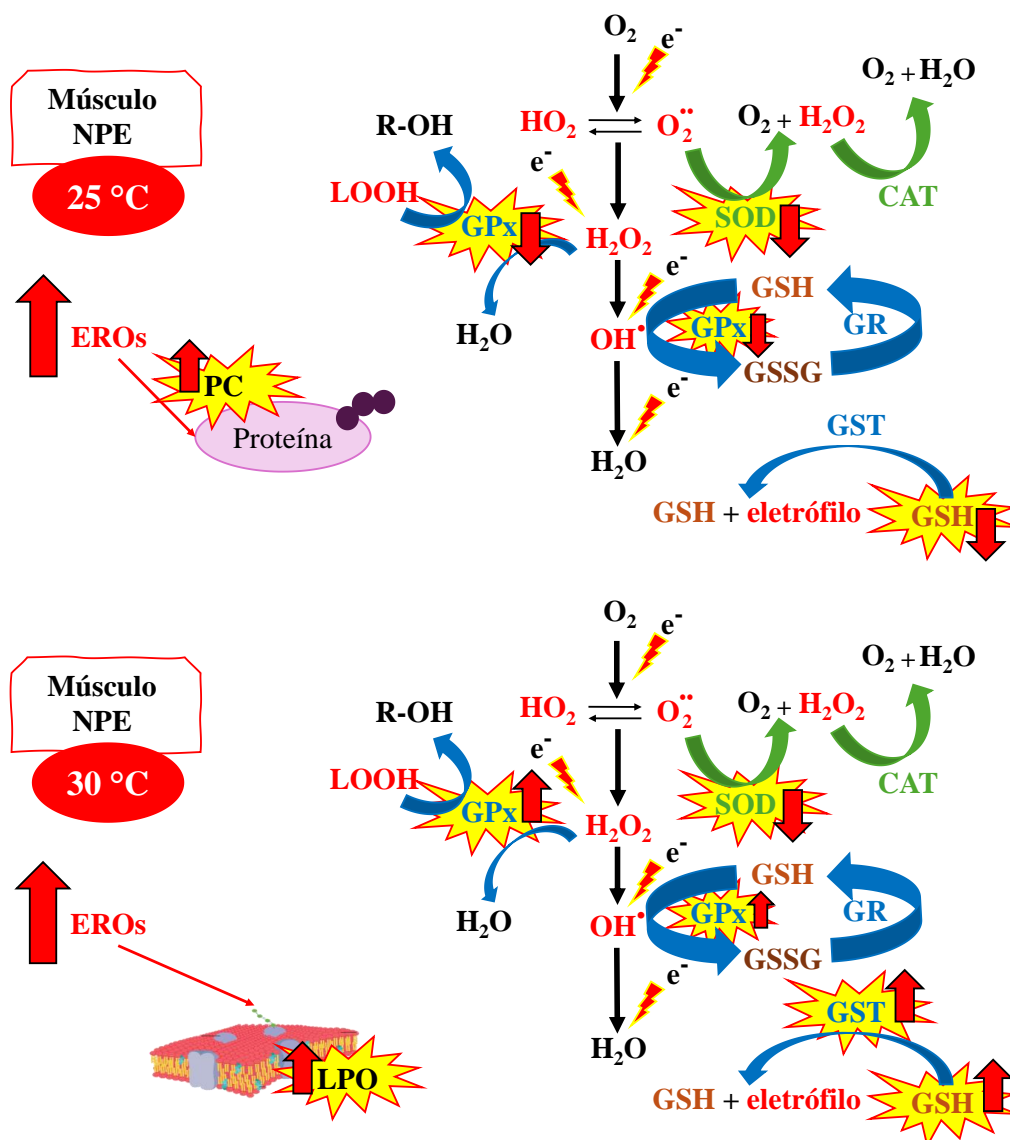
Embora alguns estudos também relatem o aumento da atividade dessas enzimas em resposta ao incremento térmico (MADEIRA et al., 2013; MADEIRA et al., 2016; KLEIN et al., 2017), todos os trabalhos que evidenciam alterações na atividade enzimática do sistema antioxidante frente ao aquecimento ambiental convergem para um ponto em comum: a indução ao estresse oxidativo. No tecido branquial dos girinos, o estado oxidativo pode ter contribuído para a redução da atividade catalítica de GST e GPx, uma vez que o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e LOOH pode sobrecarregar a capacidade funcional da GPx (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; SIES et al., 2017). Além disso, o aumento da solubilidade do NPE, favorecido pela maior fluidez das membranas em temperaturas elevadas, pode ter intensificado interações intermoleculares com as enzimas, impactando sua funcionalidade. Por fim, a disponibilidade insuficiente de GSH, essencial para o funcionamento dessas enzimas, pode ter sido um fator determinante para a redução de suas atividades.

Dessa forma, a interação entre elevação térmica e exposição a contaminantes representa um fator crítico para tecidos de organismos ectotérmicos, cuja fisiologia é diretamente dependente da temperatura ambiental. Esses resultados sugerem que mudanças climáticas podem amplificar vulnerabilidades metabólicas, exacerbando os impactos da contaminação química em estágios larvais de anfíbios.

No tecido muscular dos girinos de *A. catesbeiana*, o sistema antioxidante da glutatona foi significativamente afetado pela exposição ao NPE (30 µg L<sup>-1</sup>) a 25°C e 30°C, sendo essas alterações mais pronunciadas na temperatura elevada devido à dependência da temperatura sobre os efeitos da exposição ao NPE. A 25°C, os efeitos isolados do NPE foram novamente observados sobre ao reduzir os níveis de GSH e a atividade da GPx. Como discutido

anteriormente, o NPE pode modular a via de síntese da GSH, elevando seu conteúdo (como observado no fígado) ou comprometendo seus estoques (como observado nas brânquias), seja por indução da atividade da GR reciclando a GSSG ou pela ativação de fatores de transcrição (via Keap1-Nrf2).

**Figura 28.** Efeitos da exposição ao NPE nas duas temperaturas (25°C e 30°C) sobre os sistemas antioxidantes e a indução do estresse oxidativo no músculo dos girinos. Destaques em amarelos representam redução (seta para baixo) ou aumento (seta para cima) nos biomarcadores bioquímicos. Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutationa-S-transferase (GST); glutationa peroxidase (GPx); glutationa reduzida (GSH); glutationa redutase (GR); glutationa oxidada (GSSG); oxigênio (O<sub>2</sub>); água (H<sub>2</sub>O); elétron (e<sup>-</sup>) ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>); hidroperoxila (HO<sub>2</sub>); peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); radical hidroxila (OH<sup>•</sup>); proteína carbonilada (PC); lipoperoxidação (LPO).



Fonte: elaborado pelo autor.

Em *O. niloticus*, especificamente no tecido muscular, exposições agudas (24, 72 e 96

h) ao NP em duas concentrações (89 e 175  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) reduziram a atividade da GR em todos os tempos avaliados, comprometendo a manutenção dos níveis de GSH pela via de reciclagem da GSSG. Adicionalmente, os autores relataram aumentos significativos nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e nos produtos de LPO, sugerindo baixa eficiência da GPx muscular frente à exposição ao NP (ASIFA; CHITRA, 2016). Assim, a diminuição do conteúdo e da atividade destes biomarcadores no músculo de girinos expostos ao NPE a 25°C fortalece a hipótese de que esse contaminante interfere na homeostase redox da GSH e na funcionalidade da GPx, tornando o tecido muscular mais vulnerável a danos pelas EROs, conforme evidenciado pela elevação no conteúdo de PCs.

Entretanto, o padrão de resposta dos componentes do sistema de glutatona no tecido muscular (GSH, GST e GPx) apresentou uma clara dependência da temperatura. Essa interação entre a temperatura e a presença de NPE resultou em uma resposta adaptativa imediata, evidenciada pelo aumento dos níveis de GSH e das atividades da GPx e GST após a exposição a 30°C na tentativa de mitigar os danos oxidativos.

Uma possível explicação para o comportamento desses parâmetros é o aumento da eficiência da via Nrf2 induzida pelo estresse térmico. Em robalo (*L. maculatus*), foi relatado aumento na expressão gênica de Nrf2 e redução da expressão de Keap1 no tecido hepático após um incremento de 8°C na temperatura da água por quatro semanas (YANG et al., 2024). Em células de tecido dentário humano, a exposição ao estresse térmico (42°C por 30 min) aumentou a expressão de Nrf2, sendo este fator apontado como o principal mecanismo para combater danos oxidativos induzidos pelo aquecimento agudo (CHANG et al., 2009). Em células cancerígenas pulmonares, caracterizadas por alta expressão basal de Nrf2, Xie et al. (2020) observaram um aumento significativo na expressão desse fator após elevação da temperatura de incubação de 37°C para 42°C por 48 h.

O músculo apresenta alta expressão basal de Nrf2 devido à intensa demanda metabólica associada à contratilidade muscular (POWERS et al., 2024), expondo os miócitos a concentrações elevadas de EROs mitocondriais. A presença de altos níveis de Nrf2 nos miócitos potencializa a expressão das defesas antioxidantes. Os girinos mantidos a 30°C demonstraram maior atividade natatória em comparação aos mantidos a 25°C. Alguns estudos demonstraram uma melhoria na performance locomotora de anuros em estágios larvais e no pós-metamorfose quando expostos a temperaturas elevadas (CARVALHO et al., 2024; HE et al., 2021). O aumento da locomoção pode alterar o metabolismo muscular, induzindo maior expressão de Nrf2 e fortalecendo o sistema antioxidante da glutatona. Ostrom et al. (2021) demonstraram um aumento na expressão de Nrf2 e de ligação ao ARE no DNA, com redução

da expressão de Keap1 no músculo esquelético de camundongos submetidos a exercícios físicos.

Dessa forma, o aumento nos estoques de GSH muscular, mediado pela sinalização de Nrf2 induzida diretamente pelo estresse térmico ou indiretamente pelo aumento da performance locomotora, pode ter contribuído para os resultados observados no músculo dos girinos de rã-touro expostos ao NPE a 30°C. Com estoques elevados de GSH, a GST e a GPx aumentaram suas respectivas atividades contra as EROs. Essa adaptação pode ser crucial para a sobrevivência em curto prazo, mas a persistência dos estressores a longo prazo pode levar à exaustão do sistema, resultando em danos cumulativos. A variabilidade entre os tecidos destaca a importância de análises sistêmicas para entender a homeostase redox e os impactos de estressores ambientais.

A LPO consiste no processo oxidativo de degradação de lipídeos, particularmente dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, mediado pelas EROs. Esse evento inicia-se com a remoção de uma molécula de H<sub>2</sub>, gerando um radical lipídico e iniciando, assim, uma reação em cadeia de oxidação (NIKI, 2009). Na presença de O<sub>2</sub>, ocorre a ligação no radical lipídico formando os LOOHs. Estes compostos instáveis resultam na formação de subprodutos reativos, como malonaldeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE), que promovem danos celulares (AYALA et al., 2014). A LPO compromete a integridade da bicamada lipídica, reduzindo a fluidez e a seletividade da membrana, além de desencadear disfunções mitocondriais, apoptose e inflamação (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2015).

Proteínas que sofreram modificações oxidativas, por meio da introdução de grupos carbonila (C=O) em sua estrutura formam as PCs. Esses grupos carbonila são formados quando resíduos específicos de aminoácidos, como lisina, arginina, prolina ou treonina, são oxidados diretamente pelas EROs ou indiretamente por reações com produtos secundários da LPO, como os aldeídos reativos (BERLETT; STADTMAN, 1997). A carbonilação proteica indica dano oxidativo irreversível às proteínas. Esse processo pode levar à desnaturação proteica, perda de função enzimática, agregação de proteínas e interferência nos sistemas de reparo celular, como o sistema ubiquitina-proteassoma e as chaperonas moleculares (DALLE-DONNE et al., 2003).

Após 48 h de exposição ao NPE, os resultados de LPO nas brânquias e no músculo de girinos corroboram com estudos prévios, que demonstraram que tanto o NP quanto o NPE induzem a peroxidação lipídica em membranas celulares de diversos tecidos. Em embriões de *Danio rerio* expostos a 100 µg L<sup>-1</sup> de NP, observou-se um aumento significativo nos níveis de MDA, indicando elevação da LPO após 164 h pós-fertilização (WU et al., 2011). Salamat e Derakhshesh (2020) demonstraram a indução de LPO em culturas de hepatócitos de *L.*

*klunzingeri* após 24 h de exposições ao NP ( $10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$  e  $3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). No ciclídeo *E. maculatus*, a exposição aguda ao NP (89 e 178 µg L<sup>-1</sup>) aumentou os níveis de LPO de forma dose-dependente no tecido muscular após 24, 72 e 96 h (ASIFA; CHITRA, 2016). Em outra espécie de ciclídeo, *O. mossambicus*, o NP (15 mg L<sup>-1</sup>) induziu significativamente a peroxidação lipídica no tecido branquial após 24 e 96 h de exposição, com níveis mais elevados de LPO após 7 dias.

Por outro lado, o fígado dos girinos de *A. catesbeiana* se mostrou um tecido resistente a ação pró-oxidante do NPE, em relação a LPO, após 48 h de exposição. Entretanto, em girinos de rã-touro expostos ao NPE (30 µg L<sup>-1</sup>) por 16 dias, foi observada elevação nos níveis de LPO nos tecidos cardíaco, hepático e muscular (GONÇALVES et al., 2025). Esses resultados sugerem que, embora o fígado dos girinos apresente uma resistência relativa a exposições agudas ao NPE, a exposição prolongada pode comprometer essa proteção, resultando em um acúmulo significativo de danos oxidativos nos lipídeos. Isso destaca a importância de considerar a duração da exposição ao avaliar os efeitos tóxicos do NPE, evidenciando a necessidade de estratégias de monitoramento e mitigação em ambientes contaminados.

A composição da bicamada lipídica em anfíbios é um fato importante a ser considerado, uma vez que cadeias longas de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são essenciais para esses organismos, especialmente durante a transição do ambiente aquático para o terrestre (FRITZ et al., 2019). Além disso, animais ectotérmicos requerem quantidades significativas de AGPI devido à adaptação homeoviscosa, permitindo-lhes ajustar a fluidez das membranas em resposta a variações de temperatura (JUTFELT et al., 2024). Nesse contexto, a alta capacidade do NPE em causar disfunções na homeostase lipídica, devido à sua natureza lipofílica (LIU et al., 2023), pode ter aumentado a exposição e suscetibilidade dos AGPI às EROs acumuladas nos tecidos, em decorrência da ruptura do equilíbrio redox e desequilíbrio no sistema enzimático antioxidante promovida pelo NPE e do aumento da temperatura. O estresse térmico, por sua vez, também contribui para alterações na fluidez das membranas e na atividade enzimática, potencializando os efeitos do NPE sobre a LPO.

Sun et al. (2019) observaram um aumento nos níveis de MDA produto da LPO, no plasma, nas brânquias e no fígado de achigã (*Micropterus salmoides*) após a elevação da temperatura de 20°C para 26°C. Outro produto da LPO, o HNE, foi avaliado no músculo esquelético de enguia (*Genypterus chilensis*) e apresentou elevação significativa de seus níveis após um aumento de 5°C na temperatura (DETTLEFF et al., 2020). No músculo de rã (*Nanorana parkeri*), observou-se um aumento da LPO após 12 h de exposição a uma elevação de 6°C na temperatura, evidenciado pelo acúmulo de MDA no tecido (ZHANG et al., 2022).

Além disso, o estudo de Freitas et al. (2017) investigou a influência da temperatura (28, 32 e 36°C) sobre a exposição ao herbicida sulfentrazone em girinos (estágios 27-30 de Gosner) de *Physalaemus nattereri*. Os autores evidenciaram um aumento de LPO com respostas dependentes da temperatura. Assim, os resultados de LPO obtidos para girinos de rã-touro estão em concordância com os estudos mencionados, uma vez que a temperatura demonstrou exercer efeitos sinérgicos com a exposição ao NPE no músculo desses animais.

Em resumo, o NPE induziu a LPO nas membranas celulares por meio do acúmulo de EROs, desestabilização da homeostase lipídica e redução e sobrecarga das defesas antioxidantes enzimáticas.

A exposição aguda ao NPE (30 µg L<sup>-1</sup>) também promoveu nos girinos um aumento do conteúdo de PC nas brânquias em ambas as temperaturas avaliadas, bem como no músculo sob exposição a 25°C, sem influência da temperatura. No entanto, no tecido hepático, o aumento dos níveis de PC frente à exposição ao contaminante a 30°C foi uma resposta dependente da temperatura. Esses resultados indicam a sensibilidade deste biomarcador aos estressores químico e térmico.

Em espermatozoides de esturjão (*Acipenser ruthenus*), os níveis de PC aumentaram de forma dose-dependente após incubação com NP (5, 10 e 25 µM) por 1 h (SHALIUTINA et al., 2017). De maneira similar, ovos de ciprinídeo (*Gobiocypris rarus*) também responderam de forma dose-dependente à exposição diferentes a concentrações de NP (10, 50, 100 e 200 µg L<sup>-1</sup>), apresentando aumento nos níveis de PC (ZHANG et al., 2008). Em larvas de *Drosophila melanogaster*, exposições agudas de 24 e 48 h ao NP (0,5 e 5,0 µg mL<sup>-1</sup>) resultaram em aumento do conteúdo de PC em ambos os tempos de exposição (DWIVEDI et al., 2022). No cérebro de ratos, a exposição ao NP (25 mg kg<sup>-1</sup>) elevou os níveis de PC no córtex frontal e no hipocampo após 46 dias de exposição oral (TABASSUM et al., 2017). No *zebrafish*, a exposição ao BPA (220, 1180 e 1500 ng L<sup>-1</sup>) aumentou o conteúdo de PC em todos os órgãos avaliados (brânquias, fígado, cérebro e intestino) após 96 h de exposição (ELIZALDE-VELÁZQUEZ et al., 2023).

Apesar de a literatura não ser extensa em relação aos efeitos dos disruptores endócrinos sobre os conteúdos de carbonilação proteica em anfíbios, os resultados obtidos com diversos modelos experimentais e em diferentes tecidos corroboram a ação pró-oxidante do NPE em induzir danos oxidativos em proteínas de girinos de *A. catesbeiana*.

As proteínas membranares são predominantemente oxidadas por radicais peroxila, hidroxila e O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, enquanto as proteínas citoplasmáticas são alvos de diversas espécies reativas,

incluindo EROs, MDA ou derivados de óxido nítrico (SOHAL, 2002).

O tecido branquial dos girinos expostos a 25°C pode ter tido a funcionalidade de suas proteínas comprometidas pela ação de EROs, com a redução da atividade da SOD (comprometendo a neutralização de  $O_2^{\bullet-}$ ) e o aumento dos níveis de LPO (gerando subprodutos reativos). Na exposição a 30°C, além dessas EROs, as reduções das atividades da CAT e GPx nas brânquias, podem ter contribuído para o aumento  $H_2O_2$ , deixando os componentes celulares mais suscetíveis a ação dessas EROs. No tecido muscular, a redução na atividade da SOD e da GPx pode ter elevado a concentração de EROs a 25°C, tornando as proteínas musculares suscetíveis à oxidação por esses agentes.

Contudo, no fígado, o aumento da temperatura pode ter sido determinante para a carbonilação de proteínas nos girinos expostos ao NPE a 30°C. Nos estudos conduzidos por Zhang et al. (2022) e Bagnyukova et al. (2003) sobre marcadores de estresse oxidativo em rãs com comportamento de hibernar (*Nanorana parkeri* e *Rana ridibunda*, respectivamente), foi evidenciado o aumento do conteúdo de PC no tecido hepático após o aumento de 6°C por 12 h para *N. parkeri* e de 15°C por 24 h para *R. ridibunda*. Dessa forma, a temperatura, por meio de diversos efeitos isolados como o aumento do metabolismo basal, que eleva a geração de EROs, a alteração na termoestabilidade das enzimas antioxidantes e a desnaturação de proteínas, expondo sítios suscetíveis à carbonilação, promoveu o incremento nas concentrações de PC em girinos expostos ao NPE a 30°C. É provável que o aumento de PC também esteja associado ao acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ , decorrente do comprometimento funcional da SOD hepática.

De forma geral, o sistema antioxidante primário (SOD e CAT) e o sistema glutaciona (GST, GPx e GSH) do fígado, brânquias e músculo dos girinos de rã-touro foi prejudicado pela exposição aguda ao NPE em uma concentração ambientalmente relevante. As brânquias e o músculo apresentaram maior sensibilidade aos efeitos pró-oxidantes do NPE, possivelmente em função do maior contato com o contaminante, que é predominantemente absorvido através das brânquias ou do tegumento fino. Todos os tecidos sofreram danos decorrentes do estresse oxidativo induzido pelo NPE, evidenciados seja pelos níveis de LPO e/ou conteúdo de PC, em pelo menos uma das temperaturas avaliadas. Adicionalmente, os efeitos negativos do NPE sobre os biomarcadores antioxidantes e de estresse oxidativo demonstraram serem dependentes da temperatura no fígado (PC), nas brânquias (CAT, GST e GPx) e no músculo (GST, GPx, GSH e LPO). Tais resultados ressaltam a complexidade e a problemática dos ambientes poluídos por contaminantes químicos sob o cenário de mudanças climáticas, promovendo respostas antioxidantes negativas frente a sinergia dos estressores ambientais, impactando na

saúde dos girinos em fases de desenvolvimento pré-metamórficas.

### 4.3 Neurotoxicidade

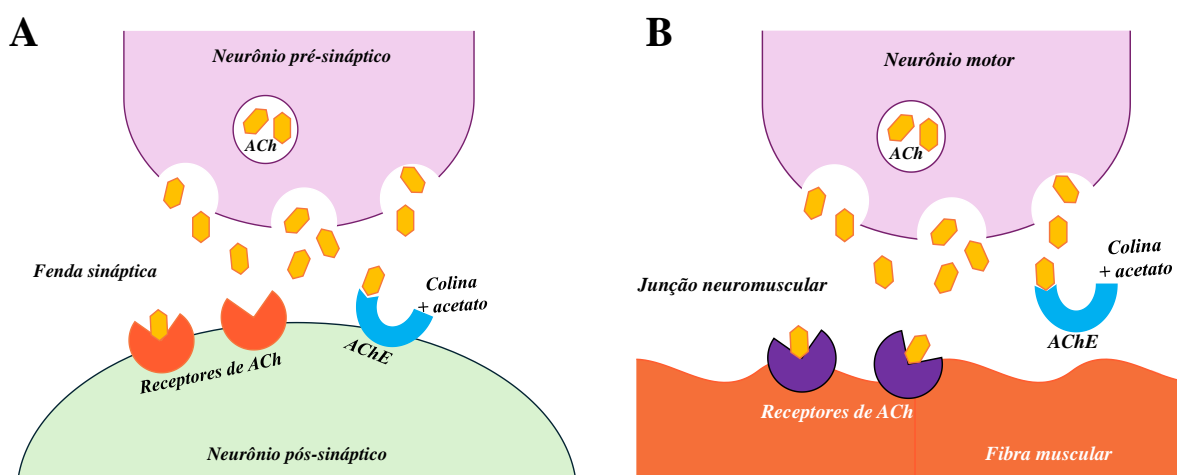
A atividade da AChE no cérebro e no músculo, desempenha um papel fundamental na regulação da neurotransmissão e na função muscular. No sistema nervoso central (SNC), a AChE é responsável pela rápida hidrólise da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, garantindo a cessação dos sinais colinérgicos e a manutenção da homeostase neurológica (STONE, 1957; FOLDES, 1978). No músculo esquelético, sua atividade é indispensável para o controle preciso das contrações musculares, garantindo a locomoção e a atividade natatória (ROTUNDO, 2020; BUKHARAEVA; SKORINKIN, 2021).

Alterações na atividade da AChE, induzidas pela exposição a contaminantes ambientais, podem comprometer tanto a função neurológica em girinos de *A. catesbeiana* quanto a muscular (OSSANA et al., 2013; CARVALHO et al., 2020), servindo como biomarcadores de toxicidade neuronal e motora. Não há estudos específicos sobre os impactos do NPE, NP e outros alquilfenóis na atividade das colinesterases em anfíbios. Entretanto, pesquisas realizadas com invertebrados, vertebrados basais e mamíferos sugerem que o NP é um potencial inibidor da AChE. Li (2008), ao investigar a interação de surfactantes com as colinesterases em organismos aquáticos, demonstrou *in vitro* que a exposição ao NP (0,5 mM) por 96 h reduziu a atividade da AChE em planárias (*Dugesia japonica*). Jones et al. (1998) relataram que a exposição de 96 h ao NP (0,22 mg L<sup>-1</sup>) diminuiu a expressão de receptores colinérgicos muscarínicos no encéfalo de três espécies de salmonídeos. Os autores sugerem que essa *downregulation* é possivelmente causada pelo acúmulo de ACh nas fendas sinápticas, resultado da inibição da AChE. Em estudos com linhagens celulares de mamíferos, Talorete et al. (2002) identificaram compostos alquilfenólicos, incluindo o NP, como inibidores da atividade colinesterásica na linhagem neuronal de rato (PC12), em concentrações de 0,8 mM após 24 h de exposição. Assim, nossos resultados representam a primeira avaliação dos impactos do NPE sobre a atividade da AChE cerebral em anfíbios, corroborando os estudos anteriores mencionados, mas em um contexto de temperatura elevada.

Com o aumento da temperatura, a biodisponibilidade do NPE pode ter sido potencializada nos girinos. Em temperaturas mais elevadas, a fluidez das membranas celulares aumenta (LOS et al., 2013). Apesar da adaptação homeoviscosa observada em animais ectodérmicos (JUTFELT et al., 2024), o aumento da fluidez pode ter favorecido a ação do NPE. Adicionalmente, a elevação térmica pode alterar os sistemas metabólicos e de transporte do organismo, facilitando a absorção e retenção de compostos químicos (NOYES et al., 2009).

Além disso, a maior parte das moléculas de AChE presentes no encéfalo corresponde a enzimas acopladas à membrana celular neuronal por meio da proteína de ancoragem rica em prolina (PRiMA) (PERRIER et al., 2002). Dessa forma, a disrupção da homeostase membranar induzida pela temperatura, associada à ação do NPE sobre os lipídeos, pode ter provocado alterações na ancoragem da AChE (**Fig. 29A**). Conforme descrito por Dobbertin et al. (2009), a ausência dessa ancoragem não apenas reduz a atividade catalítica da enzima, mas também altera sua distribuição neuronal.

**Figura 29.** Esquemas representando a localização da AChE na fenda sináptica no SNC e na junção neuromuscular. **(A)** localização da AChE na membrana celular da célula pós-sináptica, **(B)** localização da AChE na matriz extracelular.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que o efeito do NPE na atividade da AChE depende da temperatura. Dessa forma, a interação entre o estresse térmico e o estresse químico desencadeia neurotoxicidade central em girinos de *A. catesbeiana*. Esses achados destacam que animais expostos a ambientes contaminados por NPE e seus derivados apresentam maior susceptibilidade a disfunções colinérgicas, especialmente em cenários de aumento da temperatura dos corpos hídricos, efeito potencialmente exacerbado pelas mudanças climáticas em curso.

Uma vez que esse surfactante está mais disponível para comprometer a atividade da AChE, se a resposta compensatória da célula pós-sináptica, como a regulação negativa ou a redução do número de receptores colinérgicos centrais (JONES et al., 1998) não for eficaz, a estimulação excessiva do sistema colinérgico pode comprometer a capacidade funcional do animal. Esses impactos podem ser observados em alterações comportamentais como estresse e reatividade (MINEUR; PICCIOTTO, 2021), déficits cognitivos (BALLINGER et al., 2016), distúrbios respiratórios (CHATONNET et al., 2003) e disfunções neuromusculares (CAMP et

al., 2010). Adicionalmente, os girinos mantidos a 30°C apresentaram uma atividade natatória elevada durante a exposição, contrastando com os indivíduos mantidos a 25°C, que conservaram o comportamento tipicamente sedentário e bentônico das larvas de rã-touro (NIE et al., 1999). A elevação da atividade locomotora observada a 30°C pode estar diretamente associada a uma maior demanda metabólica muscular, sugerindo um mecanismo potencial para a indução da expressão e/ou atividade funcional da isoforma muscular da AChE.

As junções neuromusculares (i.e., conexões entre neurônios motores e fibras musculares) possuem como único neurotransmissor a ACh. Logo, a manutenção precisa ponto a ponto do sistema colinérgico periférico é essencial. Embora a maioria dos estudos sobre a toxicidade de contaminantes na atividade da AChE em organismos aquáticos foque no tecido nervoso, o tecido muscular demonstra ser um indicador mais sensível para prever a toxicidade aguda (PERKINS; SCHLENK, 2000; FULTON; KEY, 2001; EL-ALFY et al., 2001). Li (2008) demonstrou em seu estudo com *Poecilia reticulata* que a exposição ao NP (150 µg L<sup>-1</sup> e 300 µg L<sup>-1</sup>) por 96 h resultou na redução na atividade da AChE muscular, sem causar alterações na atividade enzimática no encéfalo dos animais a 28°C. Nossos resultados corroboram essa observação, pois o NPE mostrou reduzir a atividade da AChE muscular de girinos em ambas as temperaturas avaliadas no estudo.

Assim, conforme destacado por Li (2008), no contexto da exposição aguda ao NPE, o tecido muscular de *A. catesbeiana* parece ser um marcador mais sensível para alterações na atividade da AChE em comparação ao tecido nervoso. Os efeitos da inibição da AChE pelo NP e seus etoxilados em vertebrados aquáticos ainda são pouco estudados, sendo necessária a realização de mais pesquisas para ampliar o conhecimento sobre os impactos desse CE na atividade da AChE (LI, 2008; MALTAIS; ROY, 2014). Guilhermino et al. (2000) constatou a inibição da AChE de *Daphnia magna* por três diferentes surfactantes em concentrações variadas chegando ao máximo de 40 mg L<sup>-1</sup> dos detergentes. Adicionalmente, Kucherenko et al. (2012) no desenvolvimento de um método para determinação de surfactantes utilizando a inibição da AChE, relataram que um possível mecanismo seria que as longas caudas hidrofóbicas dos surfactantes tendem a evitar o ambiente aquoso, inserindo-se entre os núcleos hidrofóbicos de moléculas enzimáticas. Essa interação provoca alterações na estrutura tridimensional da enzima, resultando na redução de sua atividade catalítica.

A 30°C, a atividade da AChE no músculo caudal apresentou um aumento mais pronunciado do que aquele registrado a 25°C, o que pode ser explicado por dois fatores principais: (i) a enzima operando em sua faixa térmica ótima e/ou (ii) o estresse térmico induziu a síntese e ativação das *heat-shock proteins* (HSP) capazes de regular a atividade da AChE.

Estudos realizados em diferentes espécies de peixes evidenciaram um aumento da atividade da AChE muscular em exposições a temperaturas superiores à faixa térmica ideal. No robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), foi observado um aumento na atividade das colinesterases do SNC e muscular, acompanhado de descoordenação motora com a elevação de 7°C na temperatura (ALMEIDA et al., 2015). Já na cavala (*Scomber scombrus*) e na solha-europeia (*Pleuronectes platessa*), a atividade ótima da AChE foi registrada em temperaturas mais altas, entre 30 e 34°C (BOCQUENÉ et al., 1990). No zebrafish (*Danio rerio*), cuja temperaturas preferenciais variam de 20 a 30°C, exposições de 30 a 35°C também resultaram em aumento da atividade da AChE muscular (MARINHO et al., 2023). Em mamíferos, Foldes et al. (1977) relataram que a atividade da AChE no músculo esquelético de rato diminui com a redução da temperatura, enquanto sua atividade aumenta em temperaturas mais altas.

Embora esses estudos sejam majoritariamente realizados em peixes, a AChE apresenta alta conservação entre os vertebrados (PEZZEMENTI et al., 2011), o que torna possível correlacionar esses resultados com as respostas enzimáticas observadas em *A. catesbeiana*. Em anfíbios, há também relatos de aumento na atividade da AChE durante as temporadas mais quentes do ano (GÁBRIEL; BUDAI 1992; VENTURINO et al., 2003). Esses achados corroboram os estudos prévios, indicando que a temperatura exerce influência direta sobre a atividade da colinesterase muscular em diversas espécies.

Adicionalmente, o estresse térmico pode ter induzido o aumento da expressão de HSP, proteínas que atuam como chaperonas, sendo fundamentais no manejo e estruturação de outras moléculas proteicas, como enzimas, frente a condições de estresses físicos e químicos (LINDQUIST, 1986). Essas proteínas apresentam alta conservação evolutiva entre os seres vivos (ROBERT et al., 2001; HEIKKILA 2010). Segundo Lindquist (1986), as HSPs possuem a capacidade de reparar proteínas mal estruturadas ou agregadas, além de ativar moléculas inativadas. Em aves, a ativação das HSPs causou aumento da atividade de colinesterases musculares pré-existentes, que estavam inativas devido à ausência do sítio catalítico funcional (EICHLER; SILMAN, 1995). Tal mecanismo pode explicar, em parte, o aumento observado na atividade enzimática da AChE muscular em girinos do grupo Ct submetidos a 30°C. Em experimentos com linhagens de fibroblastos de rã-touro expostas a diferentes temperaturas, foi identificado um aumento na expressão gênica da HSP30 a partir de 33°C, com um ápice da *upregulation* a 35°C (MULLIGAN-TUTTLE; HEIKKILA, 2007). Nesse contexto, é possível que, a 30°C, tenha ocorrido uma regulação positiva da expressão dessa HSP no tecido muscular dos girinos, seja devido ao estresse térmico ou ao estresse oxidativo (MORIMOTO et al., 1998), o que teria levado a interações com AChEs que estavam inativas.

Diferentemente do SNC, nas junções neuromusculares, parte dessas enzimas está em forma livre, mas a maioria encontra-se ancorada à lâmina basal do tecido muscular (**Fig. 29B**) por meio da subunidade proteica colágeno Q (ColQ) (KREJCI et al., 1997). Como os fibroblastos são responsáveis pela produção da matriz extracelular, que está intimamente ligada à atividade enzimática da AChE, a proximidade das HSPs pode ter facilitado o aumento do número de enzimas com sítios de ligação ativos, potencializando a atividade enzimática observada.

Portanto, a exposição aguda ao NPE em uma concentração ambientalmente relevante induziu efeitos negativos significativos sobre a atividade de uma enzima-chave na homeostase colinérgica em girinos de rã-touro, tanto no SNC quanto no periférico. No SNC, observou-se um padrão de resposta ao NPE dependente da temperatura: sob condição termicamente elevada (30°C), o NPE comprometeu a regulação colinérgica, indicando uma interação sinérgica entre estresse térmico e o estresse químico. Dessa forma, o aumento da temperatura potencializa os efeitos tóxicos do NPE, exacerbando as disfunções neuromoduladoras e destacando a vulnerabilidade do SNC a múltiplos estressores ambientais. Em contraste, no tecido muscular, os efeitos do NPE mostraram-se independentes da temperatura. No entanto, o estresse térmico isolado promoveu um aumento na catalítica da AChE, sugerindo que o tecido muscular pode desenvolver adaptações enzimáticas para mitigar os efeitos do estresse térmico. Esses resultados reforçam a hipótese de que contaminantes emergentes, em cenários de aquecimento global, podem exacerbar desequilíbrios neurofisiológicos em organismos ectotérmicos.

## 5 Conclusão

A exposição aguda (48 h) a uma concentração ambientalmente relevante de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  do CE NPE promoveu efeitos: a) hepatotóxicos (redução do IHS e a quebra na homeostase do sistema antioxidante); b) cardiotoxicos, (redução da MVR e efeitos inotrópicos e lusitrópicos negativos); c) cronotropismo positivo (taquicardia); d) depleção das defesas antioxidantes enzimáticas e indução ao estresse oxidativo nas brânquias e no músculo; e) neurotoxicidade (inibição da AChE muscular).

O estresse térmico amplificou os efeitos negativos do CE sobre a função cardíaca, exacerbando o inotropismo negativo, levando a uma depleção acentuada das defesas enzimáticas antioxidantes nas brânquias e ao estresse oxidativo no fígado e no músculo, além da indução de neurotoxicidade no encéfalo. Dessa forma, em ambientes contaminados por NPE, o aumento da temperatura intensifica os efeitos subletais desse CE avaliado por múltiplos

biomarcadores. Isso pode promover implicações ecológicas ao comprometer o desempenho mesmo a curto prazo de girinos de rã-touro, uma espécie exótica e relativamente resistente a ambientes antropizados. Consequentemente, espécies nativas que são geralmente mais sensíveis aos múltiplos estressores podem ser mais vulneráveis.

Esses resultados destacam a necessidade urgente de ações regulatórias para estabelecer diretrizes ambientais, que são raramente utilizadas na formulação de estratégias para mitigação de contaminantes emergentes, a fim de garantir a proteção das populações de anfíbios. Essa urgência é particularmente alarmante em países como o Brasil, onde o NPE nem sequer é considerado na legislação para a proteção da vida aquática. Essas ações se tornam ainda mais necessárias frente as mudanças climáticas eminentes. O aumento progressivo da temperatura dos corpos hídricos, aliado à ausência de estratégias eficazes para a mitigação da contaminação química, expõe a biota aquática a perdas catastróficas de biodiversidade sob o cenário de aquecimento global.

## 6. Referências bibliográficas

ABBASI, S.; SICAKYÜZ, Ç. A review of the COVID-19 pandemic's effects and challenges on worldwide waste management for sustainable development. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 21, p. 8231–8260, 2024.

ABRAMOCHKIN, D. V. et al. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 268, p. 111204, 2022.

AEBI, H. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. London: Academic Press, p. 671–684, 1974.

AHEL, M. et al. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. **Chemosphere**, v. 28, n. 7, p. 1361–1368, 1994.

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) biomarker responses and behaviour: Implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015.

ALVES, M. C. P. et al. Occurrence and removal of drugs and endocrine disruptors in water supply systems in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais State, Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 7, p. 473, 2022.

ALVES, M. C. P. et al. Occurrence and removal of drugs and endocrine disruptors in water supply systems in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais State, Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 7, p. 1–17, 2022.

ALYGIZAKIS, N. et al. Change in the chemical content of untreated wastewater of Athens, Greece under COVID-19 pandemic. **Science of The Total Environment**, v. 799, p. 149230, 2021.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. (E 729-96). **Annual Book of Standards**, v. 11, n. 5, p. 220–240, 2000.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 1, p. 669–696, 2001.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 548–555, 1985.

ANGILLETTA, M. J. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. **Oxford University Press**, 2009.

APTE, U.; KRISHNAMURTHY, P. Detoxification functions of the liver. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. Boston, MA: Springer US, 2011. p. 147–163.

ARONZON, C. M.; SVARTZ, G. V.; COLL, C. S. P. Synergy between diazinon and nonylphenol in toxicity during the early development of the *Rhinella arenarum* Toad. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 5, p. 139, 2016.

ASIFA, K. P.; CHITRA, K. C. Short-term exposure to nonylphenol altered muscular antioxidant system in cichlid fish, *Etroplus maculatus* (BLOCH, 1795). **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 8, 2016.

ATTA, A. M. et al. Novel reactive polymerizable nonyl phenol ethoxylate surfactants as emulsifier in non-aqueous emulsion polymerization. **Polymer Science Series B**, v. 56, n. 6, p. 770–787, 2014.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.

- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 1, p. 21–28, 2003.
- BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 2005.
- BALLINGER, E. C. et al. Basal forebrain cholinergic circuits and signaling in cognition and cognitive decline. **Neuron**, v. 91, n. 6, p. 1199–1218, 2016.
- BARTOSZ, G. Superoxide dismutases and catalase. **Reactions, Processes: Oxidants and Antioxidant Defense Systems**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 109–149.
- BAŠKIERA, S.; GVOŽDÍK, L. Repeatability and heritability of resting metabolic rate in a long-lived amphibian. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 253, p. 110858, 2021.
- BECKER, C. G. et al. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1775–1777, 2007.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 1997.
- 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.
- BERNABÒ, I. et al. Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): Normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, n. 9, p. 455–468, 2014.
- BERNE, R. M. et al. **Berne & Levy physiology**. 6 ed. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier, 2008.
- BERS, D. M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force**. 2 ed. Dordrecht: Springer, 2001.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; ELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, p. 882–888, 1963.
- BEVAN, C. L. et al. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 488–496, 2003.

BHANDARI, G. et al. Occurrence, potential ecological risks, and degradation of endocrine disrupter, nonylphenol, from the aqueous environment. **Chemosphere**, v. 275, p. 130013, 2021.

BILHAJ, U. et al. Impact of climatic changes and global warming on water availability. **Anthropogenic Pollution Journal**, v. 5, n. 2, p. 57–66, 2021.

BLAUSTEIN, A. R. et al. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 123–140, 2003.

BLOOM, D.; DHAKSHINAMOORTHY, S.; JAISWAL, A. K. Site-directed mutagenesis of cysteine to serine in the DNA binding region of Nrf2 decreases its capacity to upregulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NADPH: quinone oxidoreductase1 gene. **Oncogene**, v. 21, n. 14, p. 2191–2200, 2002.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 30, n. 2, p. 75–89, 1990.

BOSSEN, E. H.; SOMMER, J. R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. **Tissue and Cell**, v. 16, n. 2, p. 173–178, 1984.

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.

BRANS, K. I. et al. Urban hot-tubs: Local urbanization has profound effects on average and extreme temperatures in ponds. **Landscape and Urban Planning**, v. 176, p. 22–29, 2018.

BRASILEIRO, C. A. et al. Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, p. 93–109, 2005.

BRATTSTROM, B. H. A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. **Ecology**, v. 44, n. 2, p. 238–255, 1963.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.

BRODEUR, J. C. et al. Frog body condition: Basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. **Ecological Indicators**, v. 112, p. 106098, 2020.

- BRUNELLI, E. et al. Gill alterations as biomarkers of chronic exposure to endosulfan in *Bufo bufo* tadpoles. **Histology and histopathology**, v. 25, p. 1519–1529, 2010.
- BUKHARAEVA, E. A.; SKORINKIN, A. I. Cholinergic modulation of acetylcholine secretion at the neuromuscular junction. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 57, n. 2, p. 372–385, 2021.
- BURGGREN, W. W.; FEDER, M. E.; PINDER, A. W. Temperature and the balance between aerial and aquatic respiration in larvae of *Rana berlandieri* and *Rana catesbeiana*. **Physiological Zoology**, v. 56, n. 2, p. 263–273, 1983.
- BURGGREN, W. W.; PINDER, A. W. Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. **Annual review of physiology**, v. 53, n. 1, p. 107–135, 1991.
- BURRACO, P. et al. Climate change and ageing in ectotherms. **Global Change Biology**, v. 26, n. 10, p. 5371–5381, 2020.
- CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; HERMAN, M. M. Morphometric studies of cardiac miocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 447–450, 2007.
- CAMP, S. et al. Contributions of selective knockout studies to understanding cholinesterase disposition and function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 72–77, 2010.
- CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Nonylphenol and its ethoxylates. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999. 8 p.
- CANTON, M. et al. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 3, p. H870–H877, 2004.
- CAPALDO, A. et al. Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 352–358, 2012.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. Em: Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds. **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1985. Cap 59, v. 113, p. 484–490.
- CARPENTER, S. R. et al. Global change and freshwater ecosystems. **Annual Review of**

**Ecology and Systematics**, v. 23, p. 119–139, 1992.

CARRERA, E. P. et al. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 210–217, 2007.

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. 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, J. E. et al. Early life exposure to high temperature enhances locomotor performance without alteration in thermal ecology in different populations of *Thoropa taophora* tadpoles (Anura, Cycloramphidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 227, n. 16, p. jeb247497, 2024.

CERRA, M. C.; IMBROGNO, S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 1, p. 9–25, 2012.

CHAN, K.; HAN, X.-D.; KAN, Y. W. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4611–4616, 2001.

CHANG, L.-L.; WUN, W.-S. A.; WANG, P. S. An inhibitor of 11- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (PF915275) alleviates nonylphenol-induced hyperadrenalism and adiposity in rat and human cells. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 45, 2018.

CHANG, S.-W. et al. Heat stress activates interleukin-8 and the antioxidant system via Nrf2 pathways in human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 9, p. 1222–1228, 2009.

CHATONNET, F. et al. Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 1419–1427, 2003.

CHEN, C.; HENNIG, G. E.; MANAUTOU, J. E. Hepatobiliary excretion of acetaminophen glutathione conjugate and its derivatives in transport-deficient (tr-) hyperbilirubinemic rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 6, p. 798–804, 2003.

CHITRA, K. C.; MOHAN. Response of the freshwater fish, *Oreochromis mossambicus* to the environmental pollutant, nonylphenol. **Int. J. Adv. Res.**, v. 2, p. 85–91, 2014.

CHRISTOPHE, M.; RACHID, A.; MARIO, L. Fish as reference species in different water masses. Em: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology**. 1 ed. Academic Press, 2015. Cap 13, p. 309–331.

COSTA, M. J. et al. Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4 suppl 1, p. 163–168, 2015.

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.

CUNHA, E.; DELARIVA, R. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): uma revisão. **SaBios-Revista De Saúde E Biologia**, v. 4, 2009.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169–176, 2003.

DAL-MEDICO, S. E. et al. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 168–174, 2014.

DAWOOD, M. A. O.; ALKAFIFY, M.; SEWILAM, H. The antioxidant responses of gills, intestines and livers and blood immunity of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to salinity and temperature stressors. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 397–408, 2022.

De La Parra-Guerra, A. C.; Acevedo-Barrios, R. Studies of endocrine disruptors: Nonylphenol and isomers in biological models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1439–1450, 2023.

DEVILLERS, J.; EXBRAYAT J.M. **Ecotoxicity of chemicals to amphibians**. Gordan and Breach Science, France, 1992.

DENVER, R. J. Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1163, n. 1, p. 1–16, 2009.

DETTLEFF, P. et al. Physiological and molecular responses to thermal stress in red cusk-eel (*Genypterus chilensis*) juveniles reveals atrophy and oxidative damage in skeletal muscle. **Journal of Thermal Biology**, v. 94, p. 102750, 2020.

DOBBERTIN, A. et al. Targeting of acetylcholinesterase in neurons in vivo: A dual processing function for the proline-rich membrane anchor subunit and the attachment domain on the catalytic subunit. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 14, p. 4519–4530, 2009.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 221–258, 1994.

DUELLEMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore e London. The John Hopkins University Press, 1994. 2 Ed. p. 670.

DWIVEDI, S. et al. Hsp27, a potential EcR target, protects nonylphenol-induced cellular and organismal toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Pollution**, v. 293, p. 118484, 2022.

EGALINI, F. et al. Endocrine disrupting chemicals: effects on pituitary, thyroid and adrenal glands. **Endocrine**, v. 78, n. 3, p. 395–405, 2022.

EICHLER, J.; SILMAN, I. The activity of an endoplasmic reticulum-localized pool of acetylcholinesterase is modulated by heat shock. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 4466–72, 1995.

EKELUND, R. et al. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. **Environmental Pollution**, v. 79, n. 1, p. 59–61, 1993.

EL-ALFY, A. T.; GRISLE, S.; SCHLENK, D. Characterization of salinity-enhanced toxicity of aldicarb to *Japanese medaka*: Sexual and developmental differences. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 2093–2098, 2001.

ELIZALDE-VELÁZQUEZ, G. A. et al. Acute exposure to realistic concentrations of bisphenol-A trigger health damage in fish: Blood parameters, gene expression, oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 261, p. 106610, 2023.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872–879, 2002.

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. **Chemosphere**, v. 275, p. 130000, 2021.

FICETOLA, G. F.; THUILLER, W.; MIAUD, C. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species — the American bullfrog. **Diversity and Distributions**, v. 13, n. 4, p. 476–485, 2007.

FILONCHYK, M. et al. Greenhouse gases emissions and global climate change: Examining the influence of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and N<sub>2</sub>O. **Science of The Total Environment**, v. 935, p. 173359, 2024.

FLOHÉ, L., OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 93–104, 1984.

FOLDES, F. F. Enzymes of acetylcholine metabolism. Em: FOLDES, F. F. (Ed.). **Enzymes in anesthesiology**. New York, NY: Springer New York, 1978. p. 91–168.

FRANCO, S. **Alquifenóis em água superficial: estudo analítico e determinação no Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. 2013.

FREITAS, J.; TERESA, F.; ALMEIDA, E. Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 197, 2017.

FRITZ, K. A.; WHILES, M. R.; TRUSHENSKI, J. T. Subsidies of long-chain polyunsaturated fatty acids from aquatic to terrestrial environments via amphibian emergence. **Freshwater Biology**, v. 64, n. 5, p. 832–842, 2019.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

GÁBRIEL, R.; BUDAI, D. Seasonal variations in acetylcholine content and the levels of cholinergic enzymes in the alimentary tract and heart of *Rana esculenta*. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 40, n. 3, p. 223–227, 1992.

GALLOWAY, T. S. et al. A multibiomarker approach to environmental assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 6, p. 1723–1731, 2004.

GAO, Q. et al. Nonylphenol affects myocardial contractility and L-type Ca<sup>2+</sup> channel currents

in a non-monotonic manner via G protein-coupled receptor 30. **Toxicology**, v. 334, p. 122–129, 2015.

GAO, Q. T.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Removal and biodegradation of nonylphenol by immobilized *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10230–10238, 2011.

GONÇALVES, Y. C. et al. Subchronic exposure to nonylphenol ethoxylate (NPE) induces cardiotoxicity and oxidative stress in American bullfrog tadpoles: a mechanistic approach. **Ecotoxicology**, v. 34, p. 181–192, 2025.

GONG, Y.; HAN, X. D. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 623–630, 2006.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626–629, 2004.

GREGORIO, L. S. et al. Nonylphenol and cyproterone acetate effects in the liver and gonads of *Lithobates catesbeianus* (Anura) tadpoles and juveniles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 44, p. 62593–62604, 2021.

GRIFFITHS, R. A. Temporary ponds as amphibian habitats. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 7, n. 2, p. 119–126, 1997.

GUILHERMINO, L. et al. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. **Science of The Total Environment**, v. 247, n. 2–3, p. 137–141, 2000.

GWATHMEY, J. K.; MORGAN, J. P. Calcium handling in myocardium from amphibian, avian, and mammalian species: the search for two components. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, n. 1, p. 19–25, 1991.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130–39, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 1 Ed. Oxford University Press, 2015.

HAMMOND, S. A. et al. Identification of organ-autonomous constituents of the molecular memory conferred by thyroid hormone exposure in cold temperature-arrested metamorphosing

Rana (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 17, p. 58–65, 2016.

HARRISON, S. M.; BERS, D. M. Temperature dependence of myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity of rat, guinea pig, and frog ventricular muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 258, n. 2, p. C274–C281, 1990.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 445–520, 1995.

HAYES, T. B. et al. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. Suppl 1, p. 40–50, 2006.

HE, J. et al. Influence of high temperatures and heat wave on thermal biology, locomotor performance, and antioxidant system of high-altitude frog *Nanorana pleskei* endemic to Qinghai-Tibet Plateau. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 763191, 2021.

HEGDE, G.; KRISHNAMURTHY, S. V. Analysis of health status of the frog *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) living in rice paddy fields of Western Ghats, using body condition factor and AChE content. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 69–76, 2014.

HEIKKILA, J. J. Heat shock protein gene expression and function in amphibian model systems. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 156, n. 1, p. 19–33, 2010.

HILLMAN, S. S. Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. **Journal of comparative physiology**, v. 109, n. 2, p. 199–207, 1976.

HILLMAN, S. S. et al. **Ecological and environmental physiology of amphibians**. 1 Ed. Oxford University Press, 2008.

HONG, Y. et al. Nonylphenol occurrence, distribution, toxicity and analytical methods in freshwater. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2095–2106, 2020.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.

10, n. 3, p. 327–341, 2014.

ITOH, K. et al. An Nrf2/Small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 2, p. 313–322, 1997.

JAKOB, E. M.; MARSHALL, S. D.; UETZ, G. W. Estimating fitness: A comparison of body condition indices. **Oikos**, v. 77, n. 1, p. 61, 1996.

JAMES, D. S.; ET AL. **Water quality in ponds**. Em: Dynamics of pond aquaculture. 1ed. CRC Press, 1997. p. 19.

JIA, X. X.; BURGGREN, W. W. Developmental changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) II. Sites of O<sub>2</sub>-sensitive chemoreceptors. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 16, p. 2237–2248, 1997.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.

JIN, Y. et al. Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 5–6, p. 854–861, 2010.

JONES, S. B. et al. Effects of carbaryl, permethrin, 4-nonylphenol, and copper on muscarinic cholinergic receptors in brain of surrogate and listed fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 405–414, 1998.

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, p. 184–190, 2018.

JORGEWICH-COHEN, G.; TOLEDO, L. F.; GRANT, T. Genetic structure of American bullfrog populations in Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9927, 2022.

JUTFELT, F. et al. **Effects of climate warming**. Em: ALDERMAN, S. L.; GILLIS, T. E. Encyclopedia of fish physiology. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2024. p. 14–31.

IPCC. **Climate Change 2023: Synthesis Report**. Contribution of working groups I, II and III to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC,

Geneva, Switzerland, 2023.

KANU, I.; ACHI, O. Industrial effluents and their impact on water quality of receiving rivers in Nigeria. **Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation**, v. 1, p. 75–86, 2011.

KARMAKAR, S. et al. Nonylphenol exposure in *Labeo rohita* (Ham.): Evaluation of behavioural response, histological, haematological and enzymatic alterations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 247, p. 109058, 2021.

KATO, M.; KAKO, K. J.  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  exchange of isolated sarcolemmal membrane: effects of insulin, oxidants and insulin deficiency. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 15–25, 1988.

KATS, L. B.; FERRER, R. P. Alien Blackwell Publishing, Ltd predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. **Diversity and Distributions**, 2003.

KE, Q. et al. Dose- and time-effects responses of nonylphenol on oxidative stress in rat through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 216, p. 112185, 2021.

KEEN, A. N. et al. Temperature-induced cardiac remodelling in fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 2, p. 147–160, 2017.

KEEN, A. N. et al. The dynamic nature of hypertrophic and fibrotic remodeling of the fish ventricle. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 2016.

KENNEDY, C. J.; OSACHOFF, H. L.; SHELLEY, L. K. Estrogenic endocrine disrupting chemicals in fish. Em: Fish physiology. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 33p. 257–307.

KHAN, S. et al. Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. **Environmental Research**, v. 207, p. 112609, 2022.

KIM, W.-S. et al. Effect of endocrine-disrupting chemicals on the expression of a calcium ion channel receptor (ryanodine receptor) in the mud crab (*Macrophthalmus japonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 283, p. 109972, 2024.

KLEIN, R. D. et al. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and

oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, p. 110–118, 2017.

KLUTHE, G. J.; HILLMAN, S. S. Cardiac performance correlates of relative heart ventricle mass in amphibians. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 183, n. 6, p. 801–809, 2013.

KOBAYASHI, A. et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7130–7139, 2004.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 10, p. 5751–5754, 1982.

KORKMAZ, A. et al. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2865–2871, 2010.

KREJCI, E. et al. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 36, p. 22840–22847, 1997.

KRUGER, N. J. **The Bradford method for protein quantitation**. Em: WALKER, J. M. Basic protein and peptide protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 1994. p. 9–15.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantitation. **Methods in Molecular Biology**, v. 9, p. 15, 1994.

KUCHERENKO, I. S. et al. A novel biosensor method for surfactant determination based on acetylcholinesterase inhibition. **Measurement Science and Technology**, v. 23, n. 6, p. 065801, 2012.

KUSTER, G. M. et al. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na<sup>+</sup>– Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion in cardiac myocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1182–1187, 2010.

LAJMANOVICH, R. C. et al. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 427, 2015.

LAYLAND, J., et al. The length dependence of work production in rat papillary muscles in vitro. **J Exp Biol**, v. 198, p. 2491–99, 1995.

- LEE, J.-H. et al. Inhibitory effect of octyl-phenol and bisphenol A on calcium signaling in cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 70, 2019.
- LEIKINA, E. et al. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1314–1318, 2002.
- LEVER, C. **Naturalized reptiles and amphibians of the world**. New York: Oxford University Press New York, 2023.
- LI, M.-H. Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. **Chemosphere**, v. 70, n. 10, p. 1796–1803, 2008.
- LI, M.-H. Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 781–786, 2008.
- LIER, J. B. VAN; LETTINGA, G. Appropriate technologies for effective management of industrial and domestic waste waters: The decentralised approach. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 171–183, 1999.
- LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1151–91, 1986.
- LIU, F.; CAO, X.; ZHOU, L. Lipid metabolism analysis providing insights into nonylphenol multi-toxicity mechanism. **iScience**, v. 26, n. 12, p. 108417, 2023.
- LIU, P. S.; LIU, G. H.; CHAO, W. L. Effects of nonylphenol on the calcium signal and catecholamine secretion coupled with nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. **Toxicology**, v. 244, n. 1, p. 77–85, 2008.
- LLACH, A. et al. Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 13, p. 3247–3262, 2011.
- LOAICIGA, H. A. et al. Global warming and the hydrologic cycle. **Journal of Hydrology**, v. 174, n. 1–2, p. 83–127, 1996.
- LONGHINI, L. S. et al. Thermal acclimation to the highest natural ambient temperature compromises physiological performance in tadpoles of a stream-breeding savanna tree frog. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 726440, 2021.

- LOS, D. A.; MIRONOV, K. S.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. **Photosynthesis Research**, v. 116, n. 2–3, p. 489–509, 2013.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2013.
- LUEDTKE, J.A. et al. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. **Nature**, v. 622, n. 7982, p. 308–14, 2023.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 36–41, 2006.
- MA, J. et al. Hydrological cycle changes under global warming and their effects on multiscale climate variability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1472, 2020.
- MACGOWAN, G. A.; KORETSKY, A. P. Inotropic and energetic effects of altering the force-calcium relationship: Mechanisms, experimental results, and potential molecular targets. **Journal of Cardiac Failure**, v. 6, n. 2, p. 144–156, 2000.
- MADEIRA, D. et al. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 166, n. 2, p. 237–243, 2013.
- MADEIRA, D.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324–331, 2016.
- MALTAIS, D.; ROY, R. L. Effects of nonylphenol and ethinylestradiol on copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 168–178, 2014.
- MARINHO, C. S. et al. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 222, p. 11–18, 2019.
- MATIKAINEN, N.; VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 203–220, 1992.
- MATTHEWS, J. Anthropogenic climate change impacts on ponds: a thermal mass

perspective. **BioRisk**, v. 5, p. 193–209, 2010.

MEDLER, S. Anesthetic MS-222 eliminates nerve and muscle activity in frogs used for physiology teaching laboratories. **Advances in Physiology Education**, v. 43, n. 1, p. 69–75, 2019.

MEISTER A.; ANDERSON, M. E.; HWANG, O. Intracellular cysteine and glutathione delivery systems. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 137–151, 1986.

MENKE, M. E.; CLAUSSEN, D. L. Thermal acclimation and hardening in tadpoles of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Journal of Thermal Biology**, v. 7, n. 4, p. 215–219, 1982.

MILLER, D. A. W. et al. Quantifying climate sensitivity and climate-driven change in North American amphibian communities. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3926, 2018.

MINEUR, Y. S.; PICCIOTTO, M. R. The role of acetylcholine in negative encoding bias: Too much of a good thing? **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 114–125, 2021.

MONTEIRO, D. A. **Impacto de diferentes vias de contaminação por mercúrio inorgânico sobre biomarcadores de estresse oxidativo, a função cardiorespiratória e o potencial de bioconcentração e biomagnificação em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e em traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)**. 2011. 423 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

MONTEIRO, D. A. et al. Impact of waterborne and trophic mercury exposures on cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 201, p. 26–34, 2017.

MONTEIRO, D. A. et al. Use of complex physiological traits as ecotoxicological biomarkers in tropical freshwater fishes. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 335, n. 9–10, p. 745–760, 2021.

MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 833–838, 1998.

MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto – ETE e estações de tratamento de água - ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré (UGRHI 13)**. 2009. 178 p. Tese (Doutorado em Química)

– Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

MUKHERJEE, U. et al. Chronic exposure to nonylphenol induces oxidative stress and liver damage in male zebrafish (*Danio rerio*): Mechanistic insight into cellular energy sensors, lipid accumulation and immune modulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, p. 109762, 2022.

MULLIGAN-TUTTLE, A.; HEIKKILA, J. J. Expression of the small heat shock protein gene, hsp30, in *Rana catesbeiana* fibroblasts. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 2, p. 308–316, 2007.

MUTUNGI, G.; RANATUNGA, K. W. Temperature-dependent changes in the viscoelasticity of intact resting mammalian (rat) fast and slow twitch muscle fibres. **The Journal of Physiology**, v. 508, n. 1, p. 253–265, 1998.

NAIR, P. M. G. et al. Transcriptional regulation of glutathione biosynthesis genes,  $\gamma$ -glutamyl-cysteine ligase and glutathione synthetase in response to cadmium and nonylphenol in *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 265–273, 2013.

NAKAMURA W; HOSODA S; HAYASHI K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta** v. 358, p.251–261, 1974.

NEUBAUER, S. The failing heart — an engine out of fuel. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 11, p. 1140–1151, 2007.

NIE, M.; CRIM, J. D.; ULTSCH, G. R. Dissolved oxygen, temperature, and habitat selection by bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles. **Copeia**, v. 1999, n. 1, p. 153, 1999.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 469–484, 2009.

NOYES, P. D. et al. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. **Environment International**, v. 35, n. 6, p. 971–986, 2009.

OKAI, Y. et al. Enhancing effect of the endocrine disruptor para-nonylphenol on the generation of reactive oxygen species in human blood neutrophils. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 5, p. 553–556, 2004.

OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; SALIBIÁN, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River

(Argentina). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 486–497, 2013.

OSTROM, E. L. et al. High intensity muscle stimulation activates a systemic Nrf2-mediated redox stress response. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 82–89, 2021.

PALMA, F. R. et al. ROS production by mitochondria: function or dysfunction? **Oncogene**, v. 43, n. 5, p. 295–303, 2024.

PAOLELLA, G. et al. The mechanism of cytotoxicity of 4-nonylphenol in a human hepatic cell line involves ER-stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 7, p. e22780, 2021.

PARANG, H.; ESMAEILBEIGI, M. Total mercury concentration in the muscle of four mostly consumed fish and associated human health risks for fishermen and non-fishermen families in the Anzali Wetland, Southern Caspian Sea. **Regional Studies in Marine Science**, v. 52, p. 102270, 2022.

PARIHAR, M. S. et al. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. **Journal of Thermal Biology**, v. 22, n. 2, p. 151–156, 1997.

PARK, C. J.; KANG, H. S.; GYE, M. C. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1292–1300, 2010.

PARRA-GUERRA, A. D. LA; OLIVERO-VERBEL, J. Toxicity of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p. 109709, 2020.

PERKINS, E. J. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 53, n. 2, p. 308–315, 2000.

PERRIER, A.; MASSOULIÉ, J.; KREJCI, E. PRiMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v. 33, p. 275–85, 2002.

PERROTTA, I.; TRIPEPI, S. Ultrastructural alterations in the ventricular myocardium of the adult italian newt (*Lissotriton italicus*) following exposure to nonylphenol ethoxylate. **Micron**,

v. 43, n. 2, p. 183–191, 2012.

PETERSEN, A. M.; GLEESON, T. T. Acclimation temperature affects the metabolic response of amphibian skeletal muscle to insulin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 1, p. 72–80, 2011.

PEZZEMENTI, L.; NACHON, F.; CHATONNET, A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: An atypical butyrylcholinesterase from the medaka *Oryzias latipes*. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–16, 2011.

PICKFORD, K. A. et al. Route of exposure affects the estrogenic response of fish to 4-nonylphenol. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 267–279, 2003.

PINHEIRO, J. P. S. et al. Global variation in freshwater physico-chemistry and its influence on chemical toxicity in aquatic wildlife. **Biological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1528–1546, 2021.

POPOVIĆ, N. et al. Fish liver damage related to the wastewater treatment plant effluents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 17, p. 48739–48768, 2023.

POTTIER, P. et al. **Vulnerability of amphibians to global warming.**, 2024. Disponível em: <https://ecoevorxiv.org/repository/view/6521/>. Acesso em: 18 fev. 2025.

POUNDS, J. A. Climate and amphibian declines. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 639–640, 2001.

POWERS, S. K.; LATEGAN-POTGIETER, R.; GOLDSTEIN, E. Exercise-induced Nrf2 activation increases antioxidant defenses in skeletal muscles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 224, p. 470–478, 2024.

PRAKASH, S. Condition factor, hepato-somatic index and gonado-somatic index of fish, *Channa punctatus* collected from Sawan Nallaha, Balrampur, U.P. **The Scientific Temper**, v. 13, n. 01, p. 46–50, 2022.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. CRC press, 1995.

REEVES, J. P.; BAILEY, C. A.; HALE, C. C. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 11, p. 4948–4955, 1986.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity

of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618–627, 2005.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. Em: **Oxygen Radicals in Biological Systems Part C**. Methods in Enzymology. Academic Press, 1994. v. 233, p. 357–363.

ROBERT, J. et al. Phylogenetic conservation of the molecular and immunological properties of the chaperones gp96 and hsp70. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 186–195, 2001.

ROTUNDO, R. L. Acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. **Neuroscience Letters**, v. 735, p. 135157, 2020.

SABER, S.; TITO, W.; SAID, R. Amphibians as bioindicators of the health of some wetlands in Ethiopia. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 66, p. 66–73, 2017.

SALAMAT, N.; DERAKHSHEH, N. Oxidative stress in liver cell culture from mullet, *Liza klunzingeri*, induced by short-term exposure to benzopyrene and nonylphenol. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 1183–1197, 2020.

SALLA, R. F. et al. Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 323, n. 7, p. 487–496, 2015.

SALLA, R.F. et al. Differential liver histopathological responses to amphibian chytrid infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 142, p. 177–187, 2020.

SANTOS, E. L. R. et al. Effects of sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS) on zebrafish (*Danio rerio*) gills and blood. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 87, n. 8, p. 357–370, 2024.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 15, 2014.

SEGALLA, M; et al. List of Brazilian amphibians. 2021.

SENEVIRATNE, T.; DISSANAYAKE, M.; SUMANASEKARA, V. Review on use of amphibian taxa as a bio-indicator for watershed health and stresses. v. 6, p. 178, 2015.

SHALIUTINA, O. et al. The in vitro effect of nonylphenol, propranolol, and diethylstilbestrol on quality parameters and oxidative stress in sterlet (*Acipenser ruthenus*)

spermatozoa. **Toxicology in Vitro**, v. 43, p. 9–15, 2017.

SHIELS, H. A. Avian cardiomyocyte architecture and what it reveals about the evolution of the vertebrate heart. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 377, n. 1864, p. 20210332, 2022.

SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. J. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. **Physiology**, v. 29, n. 6, p. 456–469, 2014.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservation of Brazilian amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653–658, 2005.

SILVESTRE, F. Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 333, n. 6, p. 436–448, 2020.

SOARES, A. et al. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, v. 34, n. 7, p. 1033–1049, 2008.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92–98, 2010.

SOHAL, R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 37–44, 2002.

SOLÉ, M. et al. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 24, p. 5076–83, 2000.

SOTO, A. M. et al. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. **Environmental Health Perspectives**, v. 92, p. 167–173, 1991.

STAPLES, C. A. et al. Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. **Chemosphere**, v. 38, n. 9, p. 2029–2039, 1999.

STEE, E. W. V. Autonomic innervation of the heart. **Environmental Health Perspectives**, v. 26, p. 151–158, 1978.

STONE, W. E. The role of acetylcholine in brain metabolism and function. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 36, n. 4, 1957.

STRÜSSMANN, C. et al. Amphibians and reptiles of the Brazilian Pantanal diversity, ecology, management and conservation of amphibians and reptiles of the Brazilian Pantanal: a review. p. 495–519.

STUART, S. N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783–1786, 2004.

SUN, J. L. et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 98, p. 923–936, 2020.

TABASSUM, H. et al. Role of melatonin in mitigating nonylphenol-induced toxicity in frontal cortex and hippocampus of rat brain. **Neurochemistry International**, v. 104, p. 11–26, 2017.

TAHERAN, M. et al. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 122–126, 2018.

TALORETE, T. P. N.; ISODA, H.; MAEKAWA, T. Alkylphenolic compounds and their effect on the injury rate, survival and acetylcholinesterase activity of the rat neuronal cell line PC12. Em: SHIRAHATA, S.; TERUYA, K.; KATAKURA, Y.. **Animal cell technology: Basic & applied aspects**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. p. 485–489.

TERENTYEV, D. et al. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure. **Circulation Research**, v. 103, n. 12, p. 1466–1472, 2008.

THIELE, B.; GÜNTHER, K.; SCHWUGER, M. Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 8, p. 3247–72, 1997.

TIBBITS, G. F.; HOVE-MADSEN, L.; BERS, D. M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 7, p. 2014–2019, 1991.

TOPAL, A. et al. How does elevated water temperature affect fish brain? (A neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor,

cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 115, p. 198–204, 2021.

UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. Normas de qualidade ambiental no domínio da política da água. Luxemburgo: Jornal Oficial da União Europeia, 2008. 17 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Aquatic life ambient water quality criteria – Nonylphenol. Washington, D.C., 2005. 96 p.

VASCONCELOS, T. S. et al. Biogeographic distribution patterns and their correlates in the diverse frog fauna of the Atlantic Forest hotspot. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104130, 2014.

VASSALLE, M.; LIN, C. I. Calcium overload and cardiac function. **Journal of Biomedical Science**, v. 11, n. 5, p. 542–565, 2004.

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

VIDAL-LIÑÁN, L. et al. Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gills. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 133–139, 2015.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. 2005.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disruptors: A human risk? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, n. 1–2, p. 2–9, 2005.

WASSERSUG, R. J.; PAUL, R. D.; FEDER, M. E. Cardio-respiratory synchrony in anuran larvae (*Xenopus laevis*, *pachymedusa dacnicolor*, and *Rana berlandieri*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 70, n. 3, p. 329–334, 1981.

WETHERALD, R. T.; MANABE, S. Simulation of hydrologic changes associated with global warming. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 107, n. D19, 2002.

WILHELM-FILHO, D. W. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, n. 1, p. 349–357, 2005.

WITHERS, P. C.; HILLMAN, S. S. Allometric and ecological relationships of ventricle and

- liver mass in anuran amphibians. **Functional Ecology**, v. 15, n. 1, p. 60–69, 2001.
- WOLLMUTH, L.; CRAWSHAW, L. The effect of development and season on temperature selection in bullfrog tadpoles. **Physiological Zoology**, v. 61, p. 461–469, 1988.
- WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489–492, 2004.
- WU, M. et al. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 2335–2341, 2011.
- XIE, W. et al. Nrf2/ARE pathway activation is involved in negatively regulating heat-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 4, p. 439–445, 2020.
- XU, Y.; PARK, S. J.; GYE, M. C. Effects of nonylphenols on embryonic development and metamorphosis of *Xenopus laevis*: FETAX and amphibian metamorphosis toxicity test (OECD TG231). **Environmental Research**, v. 174, p. 14–23, 2019.
- YAN, S. et al. Bisphenol A and 17 $\beta$ -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25455, 2011.
- YANAGIHARA, N. et al. Stimulation of catecholamine synthesis by environmental estrogenic pollutants. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 265–272, 2005.
- YANG, X. et al. High temperature induces oxidative stress in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) and leads to inflammation and apoptosis. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 154, p. 109913, 2024.
- YING, G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. **Environment International**, v. 28, n. 3, p. 215–226, 2002.
- YOSHIMURA, K. Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 12, p. 1590–1596, 1986.
- YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–162, 1994.
- YUAN, C. et al. Enhanced GSH synthesis by bisphenol A exposure promoted DNA methylation process in the testis of adult rare minnow *Gobiocypris rarus*. **Aquatic Toxicology**,

v. 178, p. 99–105, 2016.

YUE, D. T. Intracellular  $[Ca^{2+}]$  related to rate of force development in twitch contraction of heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 252, n. 4, p. H760–H770, 1987.

ZHANG, H. et al. Effects of acute heat exposure on oxidative stress and antioxidant defenses in overwintering frogs, *Nanorana parkeri*. **Journal of Thermal Biology**, v. 110, p. 103355, 2022.

ZHANG, X.; ZHA, J.; WANG, Z. Influences of 4-nonylphenol on doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 gene expression and vitellogenin mRNA induction of adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 196–205, 2008.

ZHAO, Y. et al. Nonylphenol and its derivatives: Environmental distribution, treatment strategy, management and future perspectives. **Chemosphere**, v. 352, p. 141377, 2024.

ZHOU, J. et al. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Thermal Biology**, v. 35, n. 6, p. 284–289, 2010.

ZIMA, A.; BLATTER, L. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 310–321, 2006.