

AVALIAÇÃO DE TRÊS TIPOS DE ÁGUA PARA USO EM PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS COM ANFÍBIOS¹

**GUILHERME FELICIONI^{2,3*}, CRISTINA BRIDI^{2,3}, JENIFER LUTEREK^{2,3}, INETE
C. BAÚ^{3,4}, FLAVIA B. CHAGAS^{3,4}, ALINE POMPERMAIER^{3,5}, PAULO A.
HARTMANN^{3,6}, MARILIA HARTMANN^{3,6}**

1 Introdução

Anfíbios anuros são amplamente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental em várias partes do mundo (Ferrante; Fearnside, 2020; Braga *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). No Brasil, diversos grupos de pesquisa utilizam suas fases larvais em bioensaios laboratoriais para verificar sua sensibilidade a compostos em ambientes aquáticos (Freitas *et al.*, 2024). Contudo, existe uma lacuna importante nos bioensaios com esse grupo, pois falta padronização de métodos com espécies nativas.

Uma divergência comum é sobre a água utilizada, pois vários estudos usam água de abastecimento declorada (e.g., Herek *et al.*, 2020, 2021), outros usam água reconstituída de acordo com a norma ABNT NBR 15088 para ensaios com peixes (e.g., Freiry *et al.*, 2014; Farias-Araujo *et al.*, 2022) e outros utilizam solução FETAX, uma água utilizada em ensaios com o anfíbio exótico *Xenopus sp* descrita no protocolo ASTM E1439. Em todos os estudos que realizam experimentos com girinos a água utilizada deve ser descrita, e quando não for reconstituída, as propriedades físico-químicas devem ser especificadas (ASTM E1439). No entanto essas propriedades são diferentes nos diversos locais de estudos.

2 Objetivos

O objetivo desse estudo foi verificar qual o tipo de água é mais adequado em protocolos para bioensaios com anfíbios nativos no Brasil, para manutenção e realização dos experimentos, utilizando girinos de *Physalaemus gracilis* como modelo.

1 Referente ao projeto intitulado: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS EM BIOENSAIOS, PES 2023 - 0384

2 Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, contato: guilherme.ferreira@estudante.uffs.edu.br

3 Grupo de Pesquisa: Biodiversidade e Conservação da Fauna.

4 Pós-Graduanda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

5 Pós-Doutoranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

6 Doutor(a) em Zoologia, Professor(a) titular em Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

3 Metodologia

Desovas de *Physalaemus gracilis* foram coletadas em uma lagoa em Erechim, RS, Brasil (27°42'5.76"S 52°25'33.6"W). As desovas foram colocadas em aquários com capacidade de 15 litros, contendo água de poço artesiano declorada, aeração artificial constante e um fotoperíodo de 12 horas claro-escuro até que os girinos atingissem o estágio 25 de desenvolvimento de acordo com Gosner (1960). Os girinos foram alimentados diariamente com ração artificial para peixes com 45% de proteína bruta (Alcon Basic, Alcon®).

Foram avaliados três tipos de água: Água de poço artesiano, Água reconstituída recomendada para peixes (Cyprinidae) e solução FETAX. A água do poço artesiano foi coletada no Campus Erechim, UFFS, sendo a mesma água utilizada para abastecimento da instituição. As características físico-químicas da água do poço foram: temperatura 24 ± 2 °C; pH $7,4 \pm 0,5$; dureza $3,57$ mg CaCO_3 L^{-1} ; oxigênio dissolvido $5,8 \pm 0,3$ mg L^{-1} ; turbidez < 1 ; condutividade 649 ± 25 $\mu\text{S cm}^{-1}$; Na = $13,01$ mg L^{-1} ; Ni = $< 0,002$ mg L^{-1} , sem cloro. A água reconstituída para peixes (Cyprinidae) seguiu a norma técnica ABNT NBR 15008, contendo 1,5 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl, 6,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 4,8 g de NaHCO_3 . A solução FETAX foi preparada conforme descrito na ASTM 1439-12, sendo composta por 625 mg de NaCl, 96 mg de NaHCO_3 , 30 mg de KCl, 15 mg de CaCl_2 , 60 mg de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 75 mg de MgSO_4 por litro de água destilada.

Foram colocados 15 girinos na fase 25 de desenvolvimento de Gosner (1960) em recipientes de vidro estéreis, com capacidade de 500 ml de água. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os níveis de oxigênio e a temperatura foram medidos diariamente. O ensaio foi semi-estático, com trocas de água a cada 3 dias e com duração total de 25 dias.

Ao final do experimento, todos os girinos foram contados e medidos quanto ao comprimento total (CT) em milímetros (mm) usando um paquímetro digital (Jomarca, ToolsBr, São Paulo, BR) e pesados para obter a massa (g) em uma balança analítica (UniBloc, Shimadzu, São Paulo, BR). A diferença estatística foi verificada pelo teste paramétrico ANOVA, usando o software GraphPad, San Diego, USA (Versão 8.0.1).

4 Resultados e Discussão

A sobrevivência dos girinos de *P. gracilis* foi semelhante nos três tipos de água testados no experimento ($F_{2,72} = 0,9135$; $p = 0,4057$), embora eles tenham sobrevivido menos na água de poço artesiano (Tabela 1). Isso pode ter acontecido pois a água de poço pode trazer

consigo diversas substâncias e microrganismos em sua composição. No estudo de Xue, *et al.* (2020) foram encontrados diversos patógenos oportunistas e microrganismos indicadores fecais em águas de poços de abastecimento nos estados unidos, no Brasil. O estudo de Silva, *et al.* (2013) feito em águas de poço utilizadas para consumo humano (como a usada nesse trabalho), encontrou concentrações elevadas de cádmio, chumbo e zinco, que podem ser nocivos tanto para plantas quanto para animais quando ingerido em altas concentrações. Estudos anteriores já indicavam uma maior mortalidade de animais em água de poço associada a outra espécie de *Physalaemus* (Ferreira; Hartmann, 2022)

Tabela 1: Sobrevivência, comprimento total e massa de girinos de *Physalaemus gracilis* mantidos nos três tipos de água (Poço Artesiano, Reconstituída e FETAX)⁷.

Água	Sobrevivência	CT (mm)	Massa (g)
Poço Artesiano	51,11% ^a	14,23±3,27 ^a	0,027±0,01 ^a
Reconstituída	73,33% ^a	19,30±3,70 ^b	0,052±0,02 ^b
FETAX	75,56% ^a	14,51±4,01 ^a	0,033±0,04 ^{ab}

Fonte: Os autores (2024)

Os girinos mantidos em água reconstituída apresentaram maior comprimento total ($F_{2,81} = 8,417$; $p = 0,0005$), quando comparados aos que estavam na água de poço e FETAX (Tabela 1). A massa foi maior nos mantidos em água reconstituída e FETAX ($F_{2,81} = 4,968$; $p = 0,0092$; Tabela 1), do que em água de poço artesiano. Um estudo anterior realizado com *P. cuvieri* mostrou maior comprimento e massa em girinos colocados em solução FETAX, embora não tenha tido diferença significativa em relação a água reconstituída para peixes (Ferreira *et al.*, 2021; 2022). Portanto, os dois tipos de águas reconstituídas em laboratório testadas com *Physalaemus* parecem ser adequadas para criação, manutenção e experimentação com esses animais.

5 Conclusão

Os dados desse estudo mostram que protocolos laboratoriais com anfíbios devem priorizar o uso de águas reconstituídas. Para girinos de *Physalaemus gracilis* a água reconstituída para peixes Cyprinidae foi a única com significativa diferença no comprimento e massa dos girinos, portanto eles cresceram e engordaram mais nessa água. Como outros

⁷ As letras diferentes mostram uma diferença significativa no teste ANOVA.

estudos mostram que *P. cuvieri* sobrevive e aumenta de comprimento e peso em solução FETAX, indicamos que essa água é uma alternativa viável, porém, mais pesquisas ainda são necessárias para entender as melhores formas de criação desses animais em laboratório.

Referências Bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com peixes (Cyprinidae). 4. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2022.

ASTM - American Society for Testing and Materials, **ASTM E1439**. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX), e1439 - 12, 2019.

FERREIRA, G. F.; HARTMANN, M. Desenvolvimento metodologias para utilização de anfíbios como bioindicadores ecotoxicológicos de contaminação na água. *In*: JORNADA DA INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 12., 2022, Chapecó. **ANAIS**. Chapecó: UFFS, 2022. Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/16915>

FERREIRA, G. F et al. Desenvolvimento de metodologias para utilização de anfíbios como bioindicadores ecotoxicológicos de contaminação na água. *In*: IX SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL E V ENCONTRO MULTIDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS DA FRONTEIRA SUL, 2022, ERECHIM-RS, 9., 2022, Erechim. **ANAIS 2022**. Erechim: UFFS, 2022. P. 44-44. Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/16915>

FERREIRA, G. F et al. Avaliação de técnicas de criação de anfíbios em laboratório para testes ecotoxicológicos. *In*: VIII SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL E V ENCONTRO MULTIDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS DA FRONTEIRA SUL., 2021, Erechim. **ANAIS 2021**. Erechim: UFFS, 2021. Disponível em: <https://ppgctauffs.wixsite.com/simposio/c%C3%B3pia-2020>

FERRANTE, L.; FEARNside, P. M. Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on amazonian frogs. **acta amazonica**, v. 50, n. 4, p. 363–366, 2020.

FREITAS, J. S.; TERESA, F. B.; ALMEIDA, E. A. 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. Toxicology & Pharmacology: CBP**, v. 197, p.

32–44, 2017.

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

HEREK, J. S et al. Genotoxic effects of glyphosate on *physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103516, 2021.

NAGUIB, M. Veterinary approach to the amphibian patient. **In practice**, v. 44, n. 2, p. 91-99. 2022.

PELUSO, J.; COLL, C. S. P.; ARONZON, C. M. *In situ* exposure of amphibian larvae (*Rhinella fernandezae*) to assess water quality by means of oxidative stress biomarkers in water bodies with different anthropic influences, **Chemosphere**, v. 271, p. 129598, 2022

SILVA, R. M. G et al. Determination of heavy metals and genotoxicity of water from an artesian well in the city of Vazante-MG, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 50, p. 6938-6943, 2013.

XUE, J et al. Zabaleta, J.; Garai, J.; Taylor, C. M.; Sherchan, S. P. Molecular detection of opportunistic pathogens and insights into microbial diversity in private well water and premise plumbing. **Journal of Water and Health**, v. 18, n. 5, p. 820-834, 2020.

ZHANG, Q et al. Size matters either way: differently-sized microplastics affect amphibian host and symbiotic microbiota discriminately. **Environmental Pollution**, v. 328, n. 121634, p. 121634, 2023.

Palavras-chave: Girinos; *Physalaemus*; Manutenção; Cativoiro.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2023-0384

Financiamento: FAPERGS