

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E AVALIAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E GENOTÓXICAS EM MODELOS  
ANIMAIS DO EXTRATO METANÓLICO DE *SERJANIA*  
*ERECTA*

Autora: Ludmila Santos Barros  
Orientador: Fábio Henrique Dyszy

Rio Verde – GO  
Outubro – 2024

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E AVALIAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E GENOTÓXICAS EM MODELOS  
ANIMAIS DO EXTRATO METANÓLICO DE *SERJANIA*  
*ERECTA*

Autora: Ludmila Santos Barros  
Orientador: Fábio Henrique Dyszy

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração em Conservação dos Recursos Naturais.

Rio Verde – GO  
Outubro – 2024

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

B277p      Barros, Ludmila Santos.  
Potencial antifúngico e avaliações comportamentais e genotóxicas em modelos animais do extrato metanólico de *serjania erecta* / Ludmila Santos Barros ; orientador Fábio Henrique Dyszy. -- Rio Verde, 2025.  
91 f.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2025.

1. *Serjania*. 2. *Fusarium sp.* 3. *Rhizoctoni sp.* 4. *Sclerotinia sclerotiorum*. 5. Extratos vegetais. 6. Fungicida. 7. Inibição fúngica. 8. Piraclostrobina. 9. Epoxiconazol. I. Dyszy, Fábio Henrique, orient. II. Título.

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

### IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- |                                                            |                                                         |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado)                  | <input type="checkbox"/> Artigo científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização)       | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação)                   | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

☐ Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

LUDMILA SANTOS BARROS

Matrícula:

2022202310840002

Título do trabalho:

"Potencial Antifúngico e Avaliações Comportamentais e Genotóxicas em Modelos Animais do Extrato Metanólico de *Serjania erecta*."

### RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: ☒ Não ☐ Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 20 /02 /2025

O documento está sujeito a registro de patente? ☐ Sim ☒ Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? ☐ Sim ☒ Não

### DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Documento assinado digitalmente  
**LUDMILA SANTOS BARROS**  
Data: 17/01/2025 16:26:50-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RIO VERDE

Local

17 /01 /2025

Data

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)

Documento assinado digitalmente

**FABIO HENRIQUE DYSZY**  
Data: 16/01/2025 11:14:59-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 69/2024 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**"Potencial Antifúngico e Avaliações Comportamentais e Genotóxicas em Modelos Animais do Extrato Metanólico de *Serjania erecta*"**

Autora: Ludmila Santos Barros  
Orientadora: Prof. Dr. Fábio Henrique Diszy

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos Recursos Naturais

APROVADA em 31 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** EDNEA FREITAS PORTILHO  
Data: 07/11/2024 11:48:19-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Lia Raquel de Souza Santos  
Avaliadora Interna  
IFGOIANO / Rio Verde

Profª. Dra. Ednea Freitas Portilho  
Avaliadora externa  
Fiscal Sanitária - Pref. de Rio Verde GO

Prof. Dr. Fábio Henrique Diszy  
Presidente da Banca  
IFGOIANO / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Fabio Henrique Dyszy, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/10/2024 10:07:59.
- Lia Raquel de Souza Santos Borges, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/10/2024 14:25:32.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 30/10/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 647444  
Código de Autenticação: 2b0dcad08c



INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
Campus Rio Verde  
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970  
(64) 3624-1000

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a minha família, em especial aos meus pais e ao meu esposo, que sempre incentivaram meus estudos, e a meus irmãos e amigos, que sempre estiveram nos bastidores aplaudindo e torcendo pelo meu sucesso. Além disso, dedico a todas as pessoas que direta e indiretamente me apoiaram, acreditando e torcendo para que eu pudesse concluir mais uma etapa de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meus pais, ao meu esposo e irmãos pelo apoio incondicional e contribuição na realização da minha formação, e pelo apoio no decorrer desta nova jornada. Também agradeço aos mestres e doutores pelos conhecimentos transmitidos e ao meu orientador. Agradeço ainda ao meu DEUS por ter sido o meu refúgio, minha fortaleza em todos os momentos, pois sempre senti sua força comigo.

Senhor, se hoje percorri este caminho é porque vós o trilhastes para mim me formastes desde o ventre de minha mãe e me designastes ser um instrumento em vossas mãos, dando-me sabedoria para aprender e discernir, alegria e entusiasmo para transmitir aos que estavam ao meu lado, coragem para lutar e perseverança para vencer.

Obrigada Senhor, por ser o que sou e por hoje chegar onde estou.

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Ludmila Santos Barros, filha de Carlos Antonio Vieira Barros e Geralda Rosana Santos Vieira, nasceu em Rio Verde, Estado de Goiás, em 25 de março de 1985. Em fevereiro de 2004, iniciou no curso de Farmácia e Bioquímica na Universidade de Rio Verde - UNIRV, formando em agosto de 2008. Em setembro de 2022, ingressou no programa de pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, em nível de mestrado, área de concentração em Conservação de Recursos Naturais, submetendo-se à defesa de dissertação em agosto de 2024, requisito indispensável para a obtenção do título de mestre.

## ÍNDICE

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| ÍNDICE DE TABELAS.....                                 | IX  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                 | XI  |
| LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES..... | XIV |
| RESUMO GERAL.....                                      | 1   |
| ABSTRACT.....                                          | 3   |
| INTRODUÇÃO GERAL.....                                  | 5   |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                        | 8   |
| OBJETIVOS .....                                        | 11  |
| OBJETIVOS GERAIS.....                                  | 11  |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                             | 11  |

### **CAPÍTULO I**

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| RESUMO.....                     | 12 |
| ABSTRACT.....                   | 14 |
| INTRODUÇÃO.....                 | 15 |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....        | 16 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....     | 19 |
| CONCLUSÕES .....                | 25 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 26 |

### **CAPÍTULO II**

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| RESUMO.....                     | 29 |
| ABSTRACT.....                   | 31 |
| INTRODUÇÃO.....                 | 33 |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....        | 35 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....     | 43 |
| CONCLUSÕES .....                | 70 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 71 |
| CONCLUSÕES GERAIS.....          | 76 |

## ÍNDICE DE TABELAS

### **CAPÍTULO I. EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE *Serjania erecta* NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS *Fusarium sp.*; *Rhizoctonia sp.*; *Sclerotinia sclerotiorum***

Tabela 1. Principais compostos isolados por cromatografia de interação hidrofóbica a partir das folhas de *S. erecta*.

### **CAPÍTULO II. AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Serjania erecta* E DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA/EPOXICONAZOL EM *Leptodactylus labyrinthicus*.**

Tabela 1. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações de *Serjania erecta* Raldk, no período de 24 horas.

Tabela 2. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações de *Serjania erecta* Raldk, no período de 48 horas.

Tabela 3. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações de *Serjania erecta* Raldk, no período de 72 horas.

Tabela 4. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações de *Serjania erecta* Raldk, no período de 96 horas.

Tabela 5. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 24 horas.

Tabela 6. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 48 horas.

Tabela 7. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 72 horas.

Tabela 8. Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 96 hrs.

## ÍNDICE DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I. EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE *Serjania erecta* NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS *Fusarium* sp.; *Rhizoctonia* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum***

Figura 1. *Serjania erecta* registrada em fragmento de Cerrado de Rio Verde, Goiás.

Figura 2. **(A)** IR do fungo *Fusarium* sp. em relação às concentrações de extrato de *S. erecta* aplicadas (doses 0 - controle negativo; 0 - 0,39 mg/mL; 1 - 0,78 mg/mL; 2 - 1,56 mg/mL; 3 - 3,12 mg/mL, 4 - controle positivo). **(B)** IR em *Fusarium* sp. em relação aos tempos de exposição aos extratos de *S. erecta*.

Figura 3. **(A)** IR do fungo *Rhizoctonia* sp. em relação às concentrações de extrato de *S. erecta* aplicadas (doses 0 - controle negativo; 0 - 0,39mg/mL; 1 - 0,78mg/mL; 2 - 1,56 mg/mL; 3 - 3,12 mg/mL, 4 - controle positivo). **(B)** IR em *Rhizoctonia* sp. em relação aos tempos de exposição aos extratos de *S. erecta*.

Figura 4. **(A)** IR do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em relação às concentrações de extrato de *S. erecta* aplicadas (doses 0 - controle negativo; 0 - 0,39mg/mL; 1 - 0,78mg/mL; 2 - 1,56 mg/mL; 3 - 3,12 mg/mL, 4 - controle positivo). **(B)** IR em *Sclerotinia sclerotiorum* em relação aos tempos de exposição aos extratos de *S. erecta*.

### **CAPÍTULO II. AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA E COMPORTAMENTAL DO EXTRATO METANÓLICO DE *Serjania erecta* E DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA/EPOXICONAZOL EM *Leptodactylus labyrinthicus*.**

Figura 1: Mapa de distribuição da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 2: *Leptodactylus labyrinthicus* (rã-pimenta)

Figura 3: Coleta dos Girinos de Rã-Pimenta

Figura 4: Aclimação dos Girinos

Figura 5: (A-C) Fotos do delineamento experimental das diferentes concentrações do extrato (31,2, 15,6, 7,8 e 3,9 mg de extrato/ml) foram utilizadas e o controle negativo com água deionada e o outro, controle positivo com ciclofosfamida.

Figura 6: Fotos do delineamento experimental das diferentes concentrações do fungicida P-EP (260g/L) / (160g/L) (0,0023 µg/L, 0,00229 µg/L, 0,00222 µg/L e 0,00216µg/L).

Figura 7: Fotos (A-D) do procedimento executado para a confecção das lâminas, foram manipuladas com amostras de sangue obtidas através da secção caudal.

Figura 8: Fotos das lâminas coradas.

Figura 9: Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 1.

Figura 10: Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 2.

Figura 11: Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 3.

Figura 12: Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 4.

Figura 13: Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 1.

Figura 14: Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 2.

Figura 15: Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 3.

Figura 16: Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 4.

Figura 17: Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 1).

Figura 18: Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 2).

Figura 19: Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 1).

Figura 20: Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 2).

Figura 21: Fotos das células de girinos *Leptodactylus labyrinthicus*, expostas a diferentes concentrações de extrato *Serjania erecta*. (A) célula micronúcleo, (B) broto nuclear, (C) lobada, (D) e (E) binucleada (F) anucleada.

Figura 22. Fotos das células de girinos *Leptodactylus labyrinthicus*, expostas a diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L). A) célula micronúcleo, (B) broto nuclear, (C) e (D) lobadas, (E) e (F) binucleada e (G) anucleada.

Figura 23. Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável micronúcleo em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 24. Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável broto nuclear em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 25. Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável núcleo lobado em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 26. Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável núcleo segmentado em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 27. Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável das células anucleadas em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 28. Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável micronúcleo em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 29. Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável núcleo lobado em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 30. Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável núcleo segmentado em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Figura 31. Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável células anucleadas em *Leptodactylus labyrinthicus*.

**LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIATÓES E UNIDADES**

|           |                                                                                             |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| ANEs      | Anormalidades nucleares eritrocitárias                                                      |
| CEUA      | Comissão de Ética no Uso de Animais                                                         |
| COND      | Condutividade                                                                               |
| CN        | Controle negativo                                                                           |
| CP        | Controle positivo                                                                           |
| CT        | Controle                                                                                    |
| ECOTOXSA  | Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal                                          |
| ICMBio    | Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade                                     |
| IBAMA     | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais                                   |
| IF Goiano | Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano                                  |
| INPE      | Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais                                                   |
| IR        | Inibição Relativa                                                                           |
| L         | Litro                                                                                       |
| MCTIC     | Ministério do Meio Ambiente e o Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações |
| mg/ml     | Miligramas por mililitro                                                                    |
| MMA       | Ministério do Meio Ambiente                                                                 |
| MN        | Micronúcleo                                                                                 |
| ONU       | Organização das Nações Unidas                                                               |
| P-EP      | Piraclostrobina/Epoxiconazol                                                                |
| pH        | Potencial hidrogeniônico                                                                    |
| TEMP      | Temperatura                                                                                 |
| RES       | Resistência                                                                                 |
| SAD       | Sistema de Alerta de Desmatamento do Cerrado                                                |
| SAL       | Salinidade                                                                                  |
| TDS       | Total de Sólidos Dissolvidos                                                                |
| µg        | Micrograma                                                                                  |

## RESUMO GERAL

BARROS, LUDMILA SANTOS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2024. **"Potencial Antifúngico e Avaliações Comportamentais e Genotóxicas em Modelos Animais do Extrato Metanólico de *Serjania erecta*."**

Orientador: Fábio Henrique Dyszy.

O largo uso de agrotóxicos vem se destacando pelo controle e prevenção de doenças resultantes de pragas que estão associadas à queda da rentabilidade e produção agrícola, mas tais produtos provocam a alteração dos ecossistemas afetando a biodiversidade de maneira negativa. A contaminação por pesticidas é um fator que impacta a vida selvagem em cenário de grande crescimento agrícola. Alguns fungos fitopatogênicos, como o *Fusarium* sp., a *Rhizoctonia* sp. e a *Sclerotinia sclerotiorum*, reduzem a produtividade de culturas agrícolas como do arroz, milho e amendoim, gerando prejuízos de produção e financeiros. Estes patógenos são controlados por fungicidas sintéticos que são nocivos aos organismos não alvo. Por outro lado, uma alternativa a este tipo de controle é o desenvolvimento de fungicidas de origem vegetal. O extrato metanólico de *Serjania erecta* Radlk, espécie nativa do Cerrado, já demonstrou efeitos de inibição do crescimento dos fungos. No entanto, há uma lacuna de conhecimento sobre os efeitos de *S. erecta* no controle de fungos de interesse agrônômico. Assim, no presente estudo, foi investigado se o extrato metanólico de *S. erecta* inibe o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp., a *Rhizoctonia* sp. e a *S. sclerotiorum*. Também foram avaliados a frequência do dano mutagênico e a preferência por substrato e comportamento natatório dos girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* expostos a diferentes concentrações do extrato de *Serjania* e do fungicida piraclostrobina/epoxiconazol (P-EP). O extrato foliar metanólico de *S. erecta* demonstrou Inibição Relativa (IR) para os três fungos estudados, sendo mais efetivo contra *S. sclerotiorum* demonstrou ação comparável ao fungicida P-EP, quando avaliado contra *S. sclerotiorum*. Tanto para o fungicida quanto para o extrato foi observado efeito de determinadas concentrações sobre a frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares. Estes achados indicam que o extrato de *S. erecta* é efetivo contra fungos danosos à atividade agrícola. Porém, como o extrato contém efeitos deletérios a girinos de *L. labyrinthicus*, foi sugerido que o uso desta substância na agricultura não seja indiscriminado. Também foi demonstrado que o teste do micronúcleo é um método

promissor como ferramenta para avaliar o efeito de novas substâncias em organismos não alvo.

**Palavras-chave:** *Serjania*; *Fusarium* sp.; *Rhizoctoni* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum*; extratos vegetais; fungicida; Inibição fúngica; Piraclostrobina; Epoxiconazol.

## ABSTRACT

BARROS, LUDMILA SANTOS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, october 2024. "**Antifungal Potential and Behavioral and Genotoxic Assessments in Animal Models of the Methanolic Extract of *Serjania erecta*.**"

Supervisor: Fábio Henrique Dyszy

The widespread use of pesticides has been highlighted for control and prevention of diseases resulting from pests that are associated with the decline in profitability and agricultural production, but such products cause changes to ecosystems and negatively affect biodiversity. Pesticide contamination is a factor that impacts wildlife in a scenario of high agricultural growth. Some phytopathogenic fungi, such as *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., and *Sclerotinia sclerotiorum*, reduce crop productivity like rice, corn, and peanuts, causing productive and financial losses. These pathogens control is conducted using synthetic fungicides, which are associated with harmful effects on non-target organisms. On the other hand, an alternative to this type of control is the development of plant-based fungicides. The methanolic extract of *Serjania erecta* Radlk, a native species of the Cerrado, has already shown the ability to inhibit fungal growth. However, there is a knowledge gap in studies of *S. erecta* effects on control of agronomic interest fungi. Therefore, in the present study, it was investigated whether the extract of *S. erecta* inhibits the growth of the phytopathogenic fungi *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., and *S. sclerotiorum*. It was also evaluated the frequency of mutagenic damage and the substrate preference and swimming behavior of *Leptodactylus labyrinthicus* tadpoles exposed to different concentrations of *Serjania* extract and the fungicide pyraclostrobin/epoxiconazole (P-EP). The methanolic leaf extract of *S. erecta* showed Relative Inhibition (RI) for the three studied fungi, being more effective against *S. sclerotiorum*, demonstrating an effect comparable to that of the commercial fungicide P-EP. Both the fungicide and the extract showed that certain concentrations influence the frequency of micronuclei and other nuclear abnormalities. These findings indicate that *S. erecta* extract is effective against fungi that are harmful to agricultural activity. However, since the extract has deleterious effects on *L. labyrinthicus* tadpoles, it was suggested that the use of this substance in agriculture should not be indiscriminate. Also it was shown that the micronucleus test is a promising method as a tool to evaluate the effect of new substances on non-target organisms.

**Keywords:** *Serjania*; *Fusarium* sp.; *Rhizoctonia* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum*; plant extracts; fungicide; fungal inhibition; Pyraclostrobin; Epoxiconazole

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é uma região extensa, abrangendo mais de 200 milhões de hectares no centro do Brasil, sendo considerada a savana tropical mais ameaçada do mundo (Hopkin, 2004). Segundo o levantamento TerraClass Cerrado referente a 2022, o bioma apresentava uma cobertura vegetal nativa de aproximadamente 48% da área total, desempenhando papel social significativo, pois diversas populações dependem diretamente dos recursos naturais para subsistência (Embrapa, 2024). Entre janeiro e julho de 2022, o Sistema de Alerta de Desmatamento do Cerrado (SAD) registrou mais de 50 mil alertas de desmatamento, com maior incidência entre maio e julho, período no qual foram devastados 2.912 km<sup>2</sup> do bioma (Oeco, 2022). Entre agosto de 2023 e junho de 2024, dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) indicaram 3.644 km<sup>2</sup> de áreas sob alerta de desmatamento. Ressalta-se que a taxa de desmatamento é avaliada anualmente, entre agosto e julho, por meio do sistema do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (Brasil, 2024).

As crescentes demandas antrópicas por água, alimentos e energia exercem intensa pressão sobre os recursos naturais, aumentando a competição pelo uso da terra e gerando desafios à preservação ambiental e à conservação da biodiversidade (Lopes *et al.*, 2020). A compreensão dessas dinâmicas é essencial para a implementação de políticas públicas racionais e planejadas, que conciliem o uso sustentável dos recursos com a manutenção dos habitats naturais, assegurando a preservação da biodiversidade e atendendo às necessidades de uma sociedade em rápido crescimento (Lopes *et al.*, 2020).

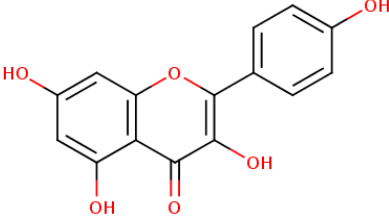
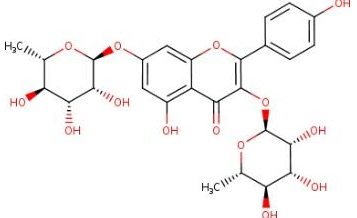
O Brasil, devido à sua extensa área agrícola, é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (Pignati *et al.*, 2017). O uso intensivo desses produtos, embora fundamental para o controle de doenças e pragas e para o aumento da produtividade agrícola, tem contribuído para a destruição de habitats naturais e ecossistemas, além de impactar negativamente a biodiversidade. A contaminação por pesticidas também representa ameaça à vida selvagem em contexto de expansão agrícola acelerada (Bernabò *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2017; Borges *et al.*, 2019a, b; Carvalho *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019; López-Gonzalez *et al.*, 2019).

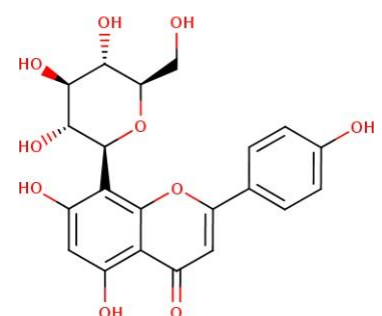
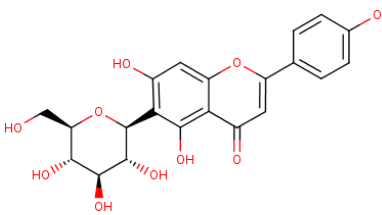
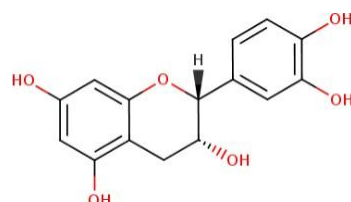
A contaminação causada por agrotóxicos afeta organismos não alvos, causando alterações adversas no crescimento, desenvolvimento, comportamento e sobrevivência de

diferentes espécies, além de comprometer funções imunológicas, fisiológicas e bioquímicas (Köhler & Triebkorn, 2013). Diversos estudos destacam os efeitos tóxicos dos agrotóxicos na fauna silvestre (Borges *et al.*, 2019a, b; Viriato *et al.*, 2021) e em seres humanos (Ramos *et al.*, 2021; Jolodar *et al.*, 2021).

Uma alternativa ao uso de agrotóxicos sintéticos é o emprego de compostos extraídos de plantas, que apresentam menor impacto ambiental (Aioub *et al.*, 2024). Por exemplo, estudos com o extrato metanólico de folhas e raízes de *Serjania erecta* demonstraram atividade antimicrobiana moderada contra *Mycobacterium tuberculosis* e efeito fungistático ou bacteriostático contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* serovar *Setubal*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* (Cardoso *et al.*, 2013). Esses efeitos estão relacionados aos principais componentes químicos do extrato metanólico foliar, conforme descrito por Cardoso *et al.* (2013) e apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais compostos isolados por cromatografia de interação hidrofóbica a partir das folhas de *S. erecta* (Cardoso et al., 2013).

| Nome do composto                               | Grupode metabólito Secundário | Estrutura Molecular                                                                   |
|------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Canferol                                       | Flavonoide                    |  |
| Canferol 3,7-di-O-<br>α-L-<br>ramnopiranosídeo | Glicosilflavonoide            |  |

|                   |                          |                                                                                     |
|-------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Vitexina          | Glicosilflavonoide       |   |
| Isovitexin<br>A   | Glicosilflavonoide       |   |
| -(-) Epicatequina | Flavonoides (Catequinas) |  |

Considerando a atividade biológica e o potencial biotecnológico de *Serjania erecta*, bem como a ausência de estudos direcionados aos fungos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*, todos de relevância agrônômica, o presente estudo tem dois objetivos principais: (1) avaliar o efeito inibitório do extrato metanólico de *S. erecta* sobre o crescimento desses fungos fitopatogênicos; e (2) investigar se o extrato de *S. erecta* e o fungicida P-EP influenciam a frequência de danos mutagênicos, a preferência por substrato e o comportamento natatório de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus*.

Caso as hipóteses de trabalho sejam confirmadas, este estudo poderá contribuir significativamente para a redução da perda de biodiversidade, ao propor alternativas baseadas no uso sustentável de compostos extraídos de plantas, alinhadas à conservação ambiental (Santos, 2003). O conhecimento sobre o potencial biotecnológico de *S. erecta* possibilita, ainda, a preservação dessa espécie e o desenvolvimento de compostos eficazes no controle do crescimento de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*. Dessa forma, o estudo promove a redução no uso de agrotóxicos sintéticos, atenuando os impactos negativos sobre o meio ambiente.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aioub, A.A.A., Ghosh, S., AL-Farga, A., Khan, A.N., Bibi, R., Elwakeel, A.M., Nawaz, A., Sherif, N.T., Elmasry, S.A., Ammar, E.E., (2024). *Back to the origins: biopesticides as promising alternatives to conventional agrochemicals*. Eur J Plant Pathol, **169**: 697–713.
- Brasil, (2024). Desmatamento no Cerrado e na Amazônia têm queda no 1 semestre de 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/secom/pt-br/assuntos/noticias/2024/07/desmatamento-no-cerrado-e-na-amazonia-tem-queda-no-1o-semester-de-2024>. Data de acesso: 07 de agosto de 2024.
- Bernabò, I., Guardia, A., Macirella, R., Sesti, S., Crescente, A., Brunelli, E., (2016). *Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (Hyla intermedia)*. Aquatic Toxicology, **172**:56–66.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Assis, R.A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., Oliveira, C., (2019a). *Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans*. Environmental Science and Pollution Research, **26**: 2623–2634.
- Borges, R.E., Santos, L.R.S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R.S., Assis, R.A., Oliveira, C., (2019 b). *Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **77**: 22-28.
- Cardoso, C. A. L., Coelho, R. G.; Honda, N. K.; Pott, A.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F., (2013). *Phenolic Compounds And Antioxidant, Antimicrobial And Antimycobacterial Activities Of Serjania erecta Radlk. (Sapindaceae)*. Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences **49**:775-782.
- Carvalho, W.F., Arcaute, C.R., Pérez-Iglesias, J.M., Laborde, M.R.R, Soloneski, S., Larramendy, M.L., (2019). *DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in Rhinella arenarum (Anura, Bufonidae) tadpoles*. Ecotoxicology, **28**: 367–377.
- Embrapa, (2024). *TerraClass apresenta resultados do mapeamento da cobertura e do uso da terra na Amazônia e Cerrado*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agricultura-digital/busca-de-noticias/>

noticia/91356370/terraclass-apresenta-resultados-do-mapeamento-da-cobertura-e-do-uso-da-terra-na-amazonia-e-cerrado. Data de acesso: 07 de agosto de 2024.

Gonçalves, M.W., Campos, C.B.M., Batista, V.G., Cruz, A.D., Demarco-Junior, P., Bastos, R.P., Silva, D.M., (2017). *Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on Dendropsophus minutus Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages*. Chemosphere, **182**: 730-737.

Hopkin, M., (2004). *Brazilian Savannah Will Disappear By 2030*. Nature. Disponível Em: <https://doi.org/10.1038/News040719> – 6. Acesso Em 23 De Junho De 2020.

Jolodar, N. R., Karimi, S., Bouteh, E., Batist, J., Prosser, R., (2021). *Human health and ecological risk assessment of pesticides from rice production in the BabolRoud River in Northern Iran*. Science of the Total Environment, **772**.

Köhler, H. R., Triebskorn, R., (2013). *Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond?* Science **341**: 6147, P. 759–765.

López-González, E.C., Siroski, P.A., Poletta, G.L., (2019). *Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on Caiman latirostris (broad-snouted caiman)*. Chemosphere, **232**: 337-344.

Lopes, V. C., Parente, L. L., Baumann, L. R. F., Miziara, F., Ferreira, L.G., (2020). *Dynamics Of Land Use In A Brazilian Agricultural Frontier Region, 1985-2017*.

Oeco, (2022). *Cerrado perde mais de 2 mil hectares de vegetação por dia, revela nova ferramenta de monitoramento: Sistema de Alerta de desmatamento do cerrado (SAD)*. Disponível em: <https://oeco.org.br/noticias/cerrado-perde-mais-de-2-mil-hectares-de-vegetacao-por-dia-revela-nova-ferramenta-de-monitoramento/>. Data de acesso: 21 de novembro de 2022.

Pignati, W.A., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C., (2017). *Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde*. Ciência e Saúde Coletiva, **22**: 3281-3293.

Ramos, J. S. A., Pedroso, T. M. A., Godoy, F. R., Batista, R. E., Almeida, F. B.; Francelin, C.; Ribeiro, F. L.; Parise, M. R.; Silva, D. M., (2021). *Multi-biomarker responses to pesticides in an agricultural population from Central Brazil*. Science of the Total Environment, **754**.

Santos, A. J., (2003). *Estimativas de Riqueza em Espécies*. In: L. Cullen Jr.; R. Rudran; C. Valladares-Pádua. (Org.). *Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre*. Curitiba: Editora da UFPR, p. 19-41,.

Santos, S.W., Gonzalez, P., Cormier, B., Mazzella, N., Bonnaud, B., Morin, S., Clérandeau, C., Morin, B., Cachot, J., (2019). *A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. *Aquatic Toxicology*, **216**: 105291.

Viriato, C., França, F.M., Santos, D. S., Marcantonio, A. S.; Badaró-Pedroso, C., Ferreira, C. M., (2021). *Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*)*. *Chemosphere*. 2021 266: 129018.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos gerais

- Investigar se o extrato foliar metanólico de *S. erecta* em diferentes concentrações inibe o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *S. sclerotiorum*;
- Avaliar se diferentes concentrações do extrato de *S. erecta* e do fungicida P-EP afetam a frequência de dano mutagênico, a preferência por substrato e o comportamento natatório dos girinos de *Leptodactylus labyrinthicus*.

#### 3.2. Objetivos específicos.

- Quantificar a inibição relativa (IR) do extrato foliar metanólico de *S. erecta* do fungicida P-EP em fungos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *S. sclerotiorum*;
- Quantificar a frequência de dano mutagênico pelo teste de micronúcleo;
- Avaliar anormalidades nucleares eritrocitárias tais como: células com broto nuclear, binucleadas, lobadas, segmentadas e anucleadas;
- Analisar se girinos de *L. labyrinthicus* preferem substrato claro ou escuro em recipiente contendo concentrações do extrato de *S. erecta* e do fungicida P-EP;
- Analisar se girinos de *L. labyrinthicus* nadam ou param em recipiente contendo concentrações do extrato de *S. erecta* e do fungicida P-EP.

## CAPÍTULO I

### **EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE *Serjania erecta* NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS *Fusarium* sp.; *Rhizoctonia* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum***

#### **RESUMO**

O uso intensivo de agrotóxicos tem se destacado ao longo dos anos, tornando-se fundamental para o controle e a prevenção de doenças e pragas, mas também está associado à queda na rentabilidade e produção agrícola. Além disso, o uso excessivo provoca a destruição de habitats naturais e ecossistemas, afetando negativamente a biodiversidade. Fungos fitopatogênicos, como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*, reduzem a produtividade de culturas agrícolas, como arroz, milho e amendoim, causando prejuízos financeiros e produtivos. Esses patógenos são controlados principalmente com fungicidas sintéticos, que, no entanto, apresentam efeitos nocivos aos organismos não alvo. Uma alternativa a esse tipo de controle é o desenvolvimento de fungicidas à base de plantas. O extrato metanólico de *Serjania erecta* Radlk, uma espécie nativa do Cerrado, já demonstrou efeitos inibitórios no crescimento dos fungos *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. O crescimento microbiano dos fungos fitopatogênicos foi avaliado após a exposição a quatro concentrações do extrato, variando de 0,39 a 3,12 mg/mL, aplicadas sobre a superfície de um meio de cultura de batata-dextrose-água. Como controle negativo, utilizou-se apenas álcool metílico, e como controle positivo, o fungicida P-EP. O extrato foliar metanólico de *S. erecta* demonstrou inibição relativa (IR) para os três fungos fitopatogênicos estudados, sendo mais efetivo contra *S. sclerotiorum*, com uma IR de 87,36%, apresentando atividade moderada contra *Rhizoctonia* sp. e baixa atividade contra *Fusarium* sp. Em testes comparativos, o extrato foliar metanólico de *S. erecta* apresentou ação contra *S. sclerotiorum* similar ao fungicida P-EP. Portanto, o extrato metanólico de *S. erecta* é uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos contra fungos prejudiciais à atividade agrícola. O uso do extrato é estratégico na redução de impactos ecológicos derivados da aplicação de fungicidas sintéticos.

**Palavras-chave:** *Serjania*; *Fusarium* sp.; *Rhizoctoni* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum*; extratos vegetais; fungicida, Inibição fúngica; Piraclostrobina; Epoxiconazol; Cerrado.

## ABSTRACT

The intensive use of pesticides has become prominent over the years, proving to be essential for controlling and preventing diseases and pests, but it is also associated with a decline in agricultural profitability and productivity. Additionally, excessive use of these chemicals leads to the destruction of natural habitats and ecosystems, negatively impacting biodiversity. Phytopathogenic fungi, such as *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., and *Sclerotinia sclerotiorum*, reduce the crop productivity like rice, corn, and peanuts, resulting in financial and productive losses. These pathogens are mainly controlled by synthetic fungicides, which, however, have harmful effects on non-target organisms. An alternative to this control method is the development of plant-based fungicides. The methanolic extract of *Serjania erecta* Radlk, a native species of the Cerrado, has already shown inhibitory effects on the growth of fungi *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The microbial growth of phytopathogenic fungi was evaluated after exposure to four extract concentrations, ranging from 0.39 to 3.12 mg/mL, applied to the surface of a potato dextrose agar culture medium. Methanol alone was used as a negative control, and the fungicide P-EP served as a positive control. The methanolic leaf extract of *S. erecta* showed relative inhibition (RI) against the three studied phytopathogenic fungi, being most effective against *S. sclerotiorum*, with an RI of 87.36%, demonstrating moderate activity against *Rhizoctonia* sp. and low activity against *Fusarium* sp. In comparative tests, the methanolic leaf extract of *S. erecta* exhibited an effect against *S. sclerotiorum* like that of the fungicide P-EP. Therefore, the methanolic extract of *S. erecta* is an option to synthetic fungicide use against harmful agricultural fungi. The extract use is strategic to reduce the ecological impacts from synthetic fungicide application.

**Keywords:** *Serjania*; *Fusarium* sp.; *Rhizoctonia* sp.; *Sclerotinia sclerotiorum*; plant extracts; fungicide; fungal inhibition; Pyraclostrobin; Epoxiconazole; Cerrado.

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço do desmatamento no Cerrado tem causado sérias consequências ambientais, incluindo fragmentação e perda de biodiversidade, aumento da incidência de espécies invasoras, erosão do solo, poluição hídrica e degradação geral dos recursos naturais (Klink e Machado, 2005). O Cerrado, reconhecido como o segundo bioma agrícola mais importante do Brasil, já teve mais da metade da vegetação natural convertida em áreas de agricultura ou pastagem (Martinelli *et al.*, 2010).

A expansão da fronteira agrícola no Cerrado também está associada ao crescente uso de produtos químicos no controle de pragas. O uso extensivo de pesticidas de alta complexidade no setor agroflorestal é fundamental para minimizar perdas de produtividade e maximizar a rentabilidade econômica (Bereś *et al.*, 2017). Entretanto, esses compostos, que possuem variados mecanismos de ação e níveis de toxicidade, têm impactos significativos na biodiversidade e na saúde humana e animal (Choudhary *et al.*, 2018).

Patógenos agrícolas, como fungos, são frequentemente combatidos com pesticidas químicos que, embora eficazes, podem gerar poluição ambiental e efeitos letais em organismos não alvo (Wachowska *et al.*, 2018). Os fungicidas sintéticos, principais agentes no controle de doenças fúngicas, apresentam desvantagens como alto custo, toxicidade residual, desenvolvimento de resistência em patógenos e impactos ambientais negativos (Kumar *et al.*, 2014).

Entre os fungos fitopatogênicos de maior relevância está *Fusarium* sp., responsável por doenças como a podridão radicular em culturas de arroz, que reduzem significativamente a produtividade e a rentabilidade agrícola (Kumar *et al.*, 2014). *Fusarium* sp. também é conhecido pela produção de micotoxinas que contaminam culturas como milho e amendoim, causando micotoxicoses em humanos e animais (Gelderblom *et al.*, 1988; Stoev, 2013). Já *Rhizoctonia* sp. afeta culturas agrícolas ao causar doenças como a ferrugem da bainha do arroz (Kumar *et al.*, 2014).

Outro patógeno importante, *Sclerotinia sclerotiorum*, causa o mofo branco, uma doença que impacta severamente a produção de feijão comum em diversas regiões do mundo, incluindo as Américas, com surtos também registrados na Austrália, África e

Ásia. Em áreas afetadas, as perdas podem variar de 30% a 100%, tornando o cultivo economicamente inviável (Schwartz e Singh, 2013).

Diante desses desafios, a pesquisa científica tem focado no desenvolvimento de fungicidas ecologicamente compatíveis (Kumar *et al.*, 2014; Aioub *et al.*, 2024). Fungicidas derivados de plantas, como óleos essenciais e extratos vegetais, ganharam destaque pelo potencial no controle de fitopatógenos (Kumar *et al.*, 2014).

Este capítulo tem como objetivo avaliar se diferentes concentrações do extrato foliar metanólico de *Serjania erecta* são capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos.

*Serjania erecta* Radlk, popularmente conhecida como cipó-cinco-folhas, cinco-folhas, retrato-de-teiú ou timbó é uma espécie nativa do Cerrado (Somner *et al.*, 2009). O gênero *Serjania* possui mais de 230 espécies distribuídas do México ao norte da Argentina, sendo o Brasil e as savanas mexicanas os principais centros de diversidade (Rodriguez *et al.*, 2014). No Brasil, são conhecidas aproximadamente 117 espécies de *Serjania*. Embora pouco estudado, o gênero apresenta propriedades biológicas diversas, como atividades analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, antiprotozoária, anticâncer, antibacteriana, larvicida, gastroprotetora e repelente (Rodriguez *et al.*, 2014). Estudos indicam que as folhas de *S. erecta* possuem elevado índice de atividade antioxidante, superior a 83%, e inibem a ação da colinesterase (Broggini *et al.*, 2010).

Neste estudo, utilizou-se um fungicida com os princípios ativos Piraclostrobina e Epoxiconazol (P-EP). Enquanto o Epoxiconazol atua de forma específica no metabolismo de fungos (Akram *et al.*, 2019), a Piraclostrobina interfere na cadeia de transporte de elétrons, sendo potencialmente tóxica para diferentes organismos (Prestes *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2021). O uso indiscriminado desse produto pode favorecer a seleção de cepas resistentes, conforme alertado na bula do fabricante. Assim, torna-se essencial o desenvolvimento de novos produtos para manejo sustentável.

A literatura científica destaca a eficácia antimicrobiana de flavonoides contra diversos microrganismos. Uma busca na base de dados Web of Science revelou 6.319 artigos publicados entre 1986 e 2022 sobre a atividade antimicrobiana de flavonoides. No entanto, apenas 229 (3,6%) abordaram microrganismos de interesse agrônomo, e somente 19 (0,3%) analisaram os impactos ambientais desses compostos. Até o momento, nenhum estudo investigou os efeitos de *S. erecta* sobre microrganismos agrônômicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Coleta do material vegetal e obtenção do extrato vegetal

A *Serjania erecta* Radlk (Figura 1), também conhecida popularmente como 'cinco-folhas' ou 'cipó-cinco-folhas', é uma planta medicinal pertencente à família Sapindaceae, que cresce até 2 metros de altura. As frutas são comestíveis e os óleos das sementes possuem distribuição incomum de ácidos graxos. Na medicina popular, as folhas são utilizadas para tratar inflamações e dores de estômago, enquanto as raízes são empregadas no tratamento da hipertensão (Pott *et al.*, 2004).

A planta pertence à família Sapindaceae e é amplamente conhecida no Brasil como 'retrato de teiú' ou 'cipó-cinco-folhas' (Guarim Neto *et al.*, 2000; Pott *et al.*, 2004).



**Figura 1.** *Serjania erecta* registrada em fragmento de Cerrado de Rio Verde, Goiás.

O extrato foliar metanólico de *S. erecta* Radlk foi obtido utilizando o método descrito por Freitas (2018). Basicamente, 1 kg de folhas saudáveis de *S. erecta*, coletadas na cidade de Rio Verde - GO, secas em estufa, trituradas em moinho de facas e os extratos foram obtidos a partir da adição do solvente álcool metílico ao pó vegetal. Após um período de 24 horas, o material foi filtrado e rota evaporado a 65°C, sendo posteriormente congelado e liofilizado. A exsicata foi depositada sob registro número 545 no Laboratório de Sistemática e Ecologia Vegetal do IF Goiano – Campus Rio Verde, tendo sido identificado por Dr. Germano Guarim Neto (Freitas, 2018).

## 2.2. Obtenção dos fungos fitopatogênicos

Os fungos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* foram obtidos a partir da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola, do Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde.

## 2.3. Obtenção do fungicida

O fungicida com formulação piraclostrobina (260 g/L) / epoxiconazol (160 g/L) foi doado pelo laboratório de Microbiologia Agrícola localizado no IF Goiano Rio Verde.

Utilizou-se este fungicida como controle positivo no experimento, pois necessitava comparar a eficácia da inibição do crescimento fúngico que foram expostos a extratos em diferentes concentrações de *S. erecta*. Ainda, este fungicida é muito utilizado em diversas culturas, como a do milho, para controle de ferrugem.

O fungicida possui registro no Ministério da Agricultura e Pecuária –MAPA sob o nº 9210.

O produto apresenta ficha de emergência com as seguintes informações: Número de Risco: 90, Número da ONU: 3082, Classe ou subclasse de risco: 9, Descrição da classe ou subclasse de risco: Substâncias e Artigos Perigosos Diversos e Grupo de Embalagem: III.

## 2.4. Ensaios de inibição do crescimento

Os microrganismos foram cultivados em meio batata-dextrose-água (200g batata, 20 g dextrose e 15g de água) diluídos em 1 L de água destilada e autoclavado.

Os fungos fitopatogênicos foram expostos a seis tratamentos em quatro diferentes concentrações do extrato (0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg de extrato/mL), obtidas pela diluição em álcool metílico, seguindo o método de Freitas, 2018 e mais dois tratamentos, sendo um deles o controle negativo com álcool metílico e o outro, controle positivo com fungicida P-EP. Os fungos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* foram acondicionados em estufa, a 30°C e o fungo *S. sclerotiorum* foi acondicionado sob a temperatura de 22°C. Os bioensaios foram repetidos por 5 vezes, de forma independente. A avaliação do experimento teve início 24 horas após o início da incubação, sendo, a partir de então, avaliado o diâmetro do micélio fúngico a cada 12h.

## 2.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos no trabalho foram mensurados em termos de inibição relativa porcentual (IR%) (Shiomi *et al.*, 2008, Bulhões *et al.*, 2019) que foi calculada de acordo com a equação 1:

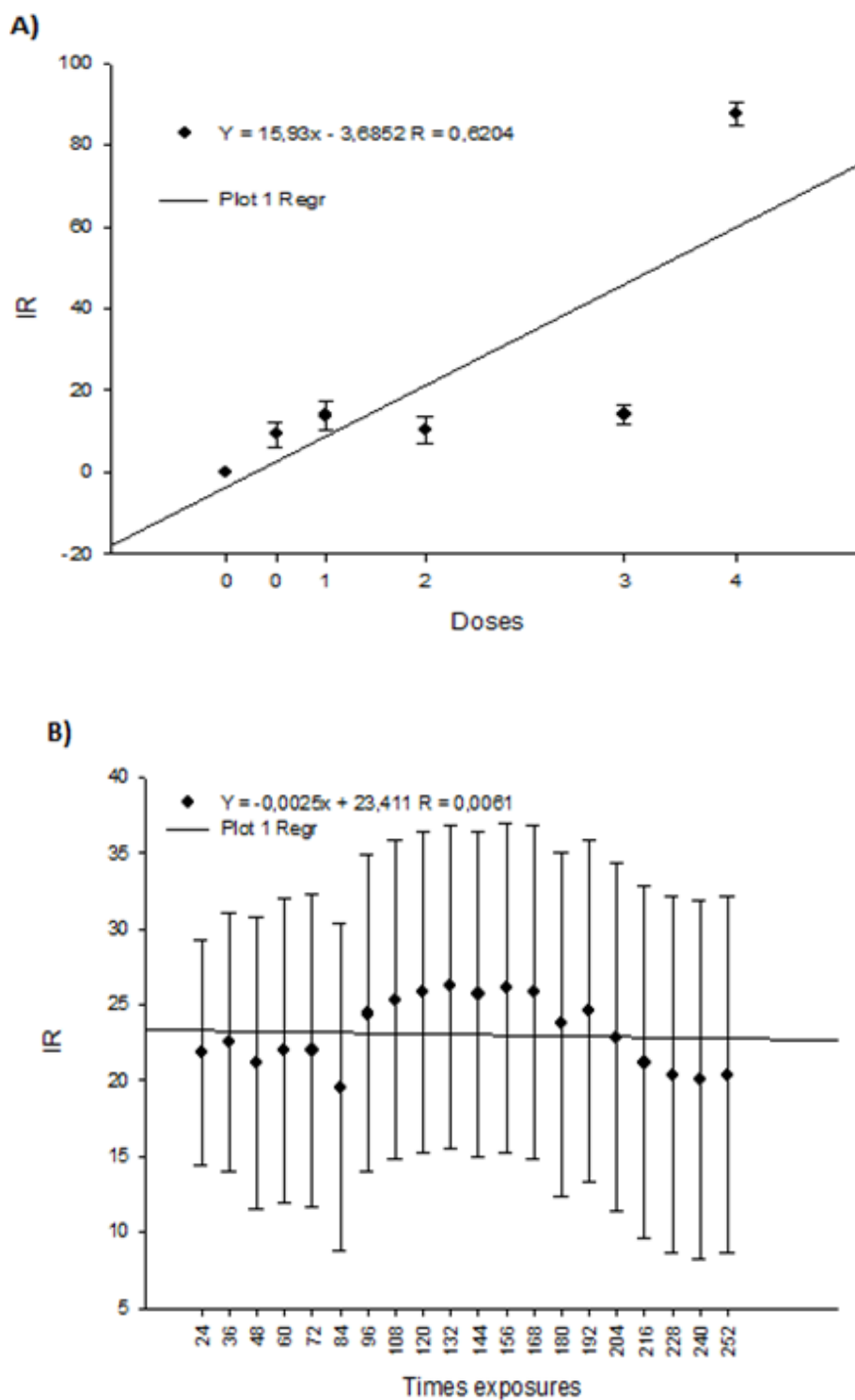
$$IR\% = \frac{R_c - R_x}{R_c} \times 100 \text{ (equação 1)}$$

em que IR% é a inibição relativa porcentual,  $R_c$  é o raio (em mm) da colônia do patógeno no tratamento controle negativo e  $R_x$  é o raio (em mm) da colônia do patógeno no tratamento experimental com o extrato foliar metanólico de *S. erecta* ou na presença do fungicida comercial piraclostrobina/epoxiconazol. Adotar-se-á um delineamento experimental inteiramente ao acaso com 5 repetições e os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Shiomi *et al.*, 2008, Bulhões *et al.*, 2019).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade antifúngica do extrato vegetal, diferentes concentrações do extrato metanólico de *Serjania erecta* foram adicionadas às culturas microbianas. O monitoramento iniciou 24 horas após a incubação, com a mensuração do diâmetro do micélio fúngico a cada 12 horas. As avaliações seguiram até que o crescimento total fosse alcançado nos fungos do controle negativo em placas de Petri, conforme ilustrado nas Figuras 2-B, 3-B e 4-B.

No fungo *Fusarium sp.*, observou-se a Inibição Relativa Percentual (IR) em relação aos efeitos das doses, do tempo e da interação entre doses x tempo, conforme a apresentação da figura 2.

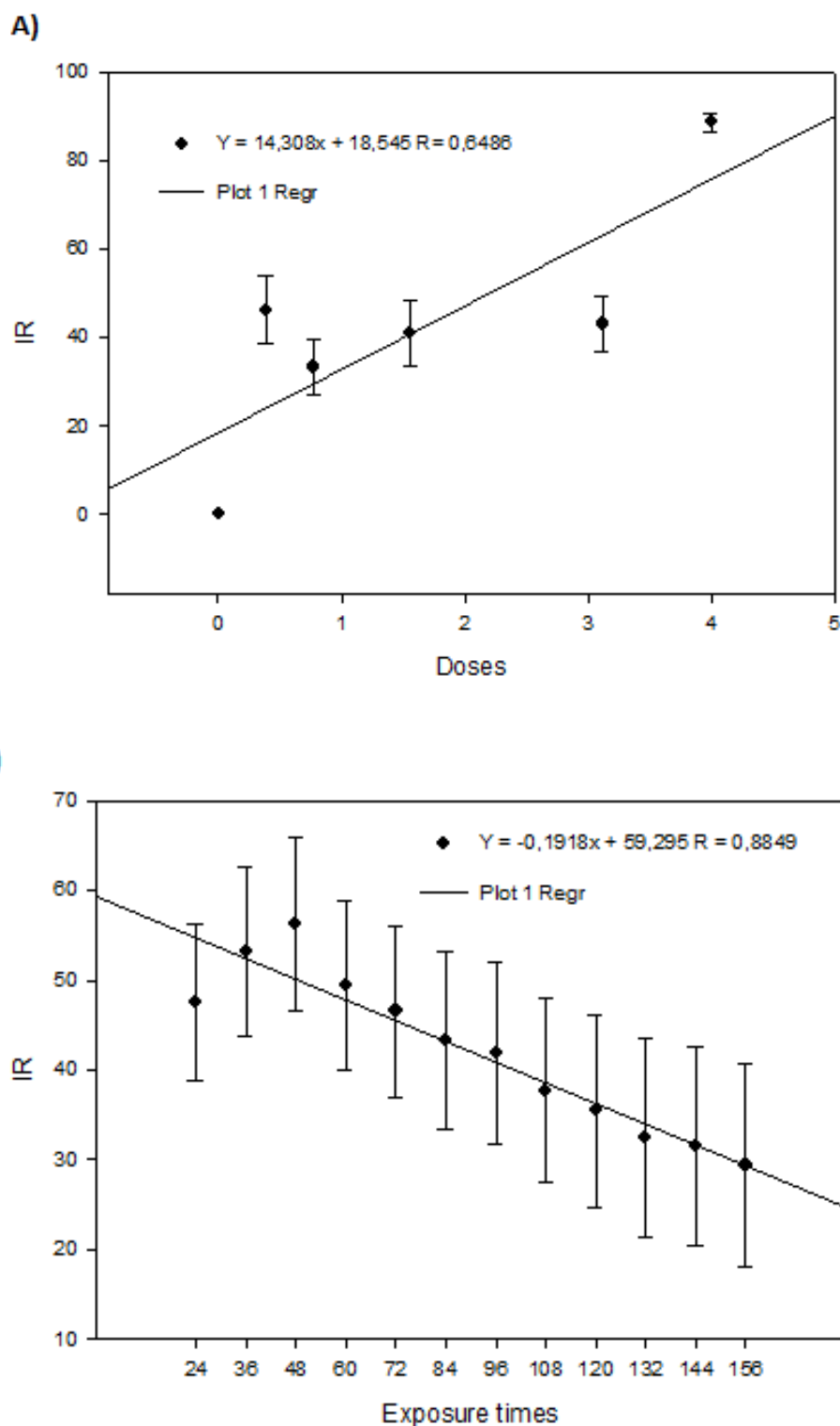


**Figura 2. (A)** IR do fungo *Fusarium sp.* em relação às concentrações de extrato de *S. erecta* aplicadas (doses 0 - controle negativo; 0 - 0,39 mg/mL; 1 - 0,78 mg/mL; 2 - 1,56 mg/mL; 3 - 3,12 mg/mL, 4 - controle positivo). **(B)** IR em *Fusarium sp.* em relação aos tempos de exposição aos extratos de *S. erecta*.

Para *Fusarium sp.*, a Inibição Relativa Percentual (IR) foi analisada em função das doses, do tempo de exposição e da interação entre essas variáveis ( $F = 2055.402$ ;  $p < 0.0001$ ;  $F = 2.865$ ;  $p < 0.0001$ ;  $F = 2.787$ ;  $p < 0.0001$ , respectivamente). Observou-se

efeito linear das doses, com menor índice de IR no controle negativo (dose 0) e maior índice no controle positivo (87,57). Entre as doses do extrato de *S. erecta*, o menor índice foi registrado na segunda dose (9,09) e o maior na quinta dose (14,07). Em relação aos tempos de exposição, não houve homogeneidade nos efeitos. O maior índice de inibição foi observado no décimo tempo (26,18) e o menor no sexto tempo (19,51).

No fungo, *Rhizoctonia* sp observou-se a IR em relação aos efeitos das doses, do tempo e da interação entre doses x tempo, conforme figura 3.



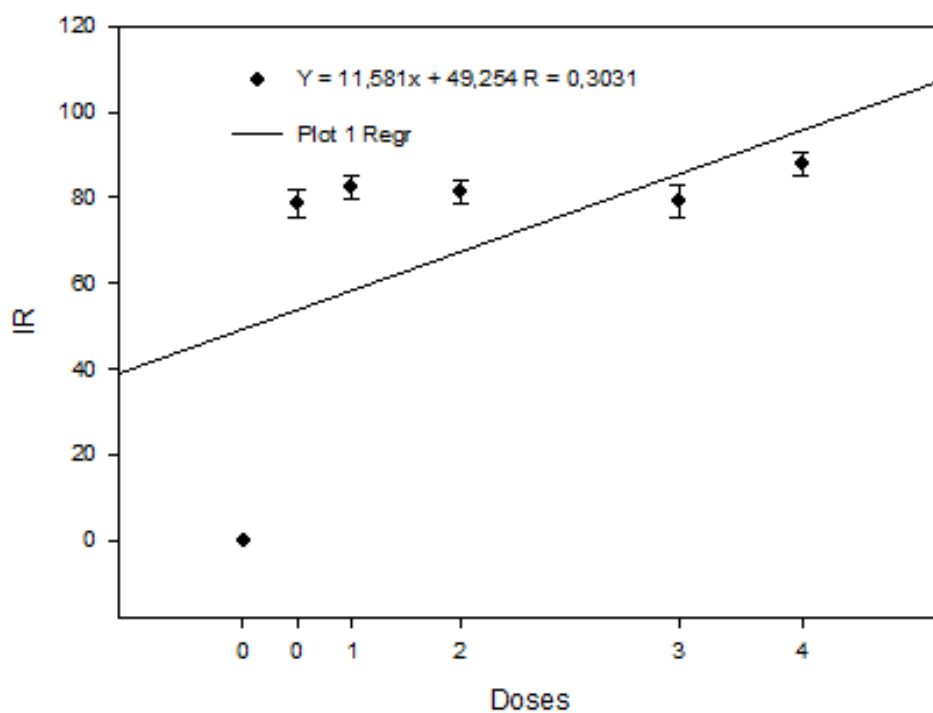
**Figura 3. (A)** IR do fungo *Rhizoctonia* sp. em relação às concentrações de extrato de *S. erecta* aplicadas (doses 0 - controle negativo; 0 - 0,39mg/mL; 1 - 0,78mg/mL; 2 - 1,56 mg/mL; 3 - 3,12 mg/mL, 4 - controle positivo). **(B)** IR em *Rhizoctonia* sp. em relação aos tempos de exposição aos extratos de *S. erecta*.

Para *Rhizoctonia* sp., a IR também foi analisada em função das doses, do tempo de exposição e da interação entre doses e tempo ( $F = 273.905$ ;  $p < 0.0001$ ;  $F = 13.235$ ;  $p$

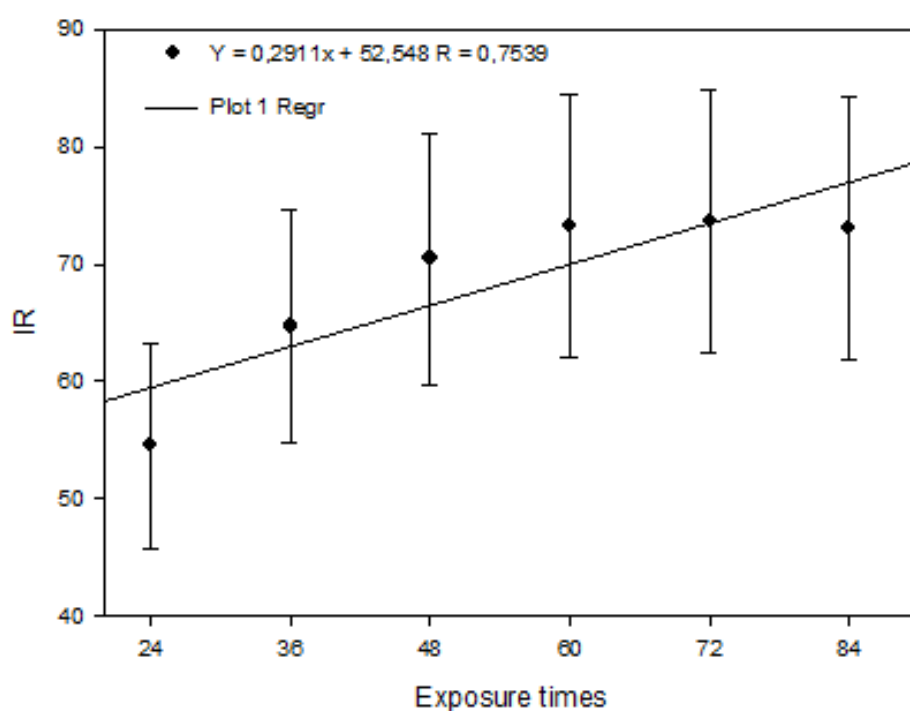
$< 0.0001$ ;  $F = 3.010$ ;  $p < 0.0001$ , respectivamente). Houve efeito linear das doses, com menor índice no controle negativo (dose 0) e maior índice no controle positivo (88,54). Entre as doses do extrato, o menor índice foi registrado na terceira dose (33,29) e o maior na segunda dose (46,25). Em relação ao tempo de exposição, o maior índice de inibição foi observado no terceiro tempo (56,17), enquanto o menor foi no décimo segundo e último tempo (29,35).

No fungo *S. sclerotiorum* observou-se a IR em relação aos efeitos das doses, do tempo e da interação entre doses x tempo, conforme figura 4.

A)



B)



**Figura 4.** (A) IR do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em relação às concentrações de extrato de *S. erecta* aplicadas (doses 0 - controle negativo; 0 - 0,39mg/mL; 1 - 0,78mg/mL; 2 - 1,56 mg/mL; 3 - 3,12 mg/mL, 4 - controle positivo). (B) IR em *Sclerotinia sclerotiorum* em relação aos tempos de exposição aos extratos de *S. erecta*.

O extrato foliar metanólico de *S. erecta* demonstrou eficácia contra *S. sclerotiorum*, com inibição fúngica similar ao controle positivo na terceira dose. O extrato também apresentou atividade moderada contra *Rhizoctonia* sp., mas baixa eficácia contra *Fusarium* sp. Flavonoides, metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas, são conhecidos pela ação antifúngica em organismos patogênicos e por mecanismos como rompimento da membrana plasmática, disfunção mitocondrial, inibição da síntese de moléculas orgânicas, formação da parede celular e ciclo celular. Entre os compostos isolados de extratos foliares de *S. erecta*, destacam-se o canferol e a epicatequina, explicando os resultados observados para *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. (Cardoso *et al.*, 2013; Aboody & Mickymaray, 2020).

Os dados obtidos sugerem que *S. sclerotiorum*, um ascomiceto patogênico em diversas culturas, produz enzimas líticas e toxinas capazes de degradar as paredes celulares de plantas hospedeiras, promovendo a infecção (Duo *et al.*, 2025). Flavonoides são descritos como inibidores enzimáticos (Shen *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2022) e podem atuar reduzindo a eficiência dessas enzimas, inibindo o crescimento e a germinação dos esporos. Por outro lado, *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp. podem possuir mecanismos de detoxificação mais eficazes ou estratégias adaptativas metabólicas (Fisher *et al.*, 2022; Duo *et al.*, 2025).

Pesquisas futuras devem aprofundar-se o estudo do potencial antifúngico do extrato metanólico de *S. erecta*. Serão necessários experimentos para determinar a concentração mínima inibitória para *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *S. sclerotiorum*, além de identificar e caracterizar os metabólitos ativos presentes no extrato. Estudos sobre os mecanismos de ação e a citotoxicidade do extrato, bem como o desenvolvimento de metodologias de purificação ou síntese dessas moléculas, poderão viabilizar o uso de *S. erecta* como pesticida natural, auxiliando para o controle de fungos fitopatogênicos e reduzindo impactos ambientais.

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato foliar metanólico de *S. erecta* foi mais eficaz contra *S. sclerotiorum*. Contra *Rhizoctonia* sp., o extrato demonstrou atividade moderada, enquanto contra *Fusarium* sp., a atividade foi mínima. A redução observada no IR% do crescimento de *Rhizoctonia* sp. na presença do extrato foliar metanólico de *S. erecta* pode ser atribuída à

capacidade da substância de degradar compostos aromáticos e fluoretados ou clorados. Embora esta propriedade de degradação não seja uma característica desejada no contexto deste estudo, a habilidade de *Rhizoctonia sp.* em metabolizar compostos aromáticos pode ser ecologicamente relevante, sugerindo que esse microrganismo possui potencial para ser utilizado como biorremediador, degradando xenobióticos presentes no meio ambiente, como observado para *Pseudomonas sp.*

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboudy, Mickymaray., (2020). *Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids*. Antibiotics, **9**(2), 45.
- Aioub, A.A.A., Ghosh, S., AL-Farga, A., Khan, A.N., Bibi, R., Elwakeel, A.M., Nawaz, A., Sherif, N.T., Elmasry, S.A., Ammar, E.E., (2024). *Back to the origins: biopesticides as promising alternatives to conventional agrochemicals*. Eur J Plant Pathol, **169**: 697–713.
- Akram, M., Patt,M., Kaserer, T., Temml, V., Waratchareeyakul, W., Kratschmar, D. V., Hauptenthal, J., Hartmann, R. W., Odermatt, A., Schuster, D., (2019). *Identification of the Fungicide Epoxiconazole by Virtual Screening and Biological Assessment as Inhibitor of Human 11 $\beta$ -Hydroxylase and Aldosterone Synthase*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **192**:105358.
- Bereś, Pk, Kucharczyk, H., Górski, D., (2017.) *Efeitos De Inseticidas Usados Contra A Broca Do Milho Europeia Na Abundância De Tripes No Milho*. Plant Prot. Sci. **53**(1), 44-49.
- Broggini, L. S. C., Fernandes, R. S., Nogueira, T., Suzano, F. R., Caetano, A. L., Buck, H. S., Couto, L. B., França, S. C., Pereira, P. S., (2010). *Behavioral and enzymatic bioassays with Serjania erecta Radlk., Sapindaceae, correlated with cognitive dysfunctions*, Revista Brasileira de Farmacognosia, **20**: 4, p.519-528.
- Bulhões, C. C., Melo, I. S, Shiomi, H. F., (2019). *Biocontrole da Antracnose em Frutos de Maracujá Amarelo por Bactérias Antagônicas a Fitopatógenos*. Scientific Electronic Archives **12**: 10-16.
- Cardoso, C. A. L., Coelho, R. G., Honda, N. K., Pott, A., Pavan, F. R., Leite, C. Q. F., (2013). *Phenolic Compounds And Antioxidant, Antimicrobial And Antimycobacterial*

*Activities Of Serjania erecta Radlk. (Sapindaceae).* Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences **49**:775-782.

Choudahary, S., Yamini, Raheja n., Yaday, Sk, kamboj, Ml, Dharma, A., (2018). *Uma Revisão: Resíduo De Pesticida: Causa De Muitos Problemas De Saúde Animal.* J. Entomol. Zool. Viga. **6**(3), 330-333

Duo, H., Yin, M., Wang, R., (2025). *Molecular mechanisms of resistance and future perspectives in plant breeding strategies against Sclerotinia sclerotiorum.* New Crops **2**: 100046.

Fisher, M.C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J. et al. (2022). *Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health.* Nat Rev Microbiol **20**, 557–571.

Freitas, S., T., F., (2018). *Potencial De Extratos De Plantas No Controle De Insetos-Praga: Um Levantamento Cienciométrico E Análises De Efeitos Biológicos De Extratos Foliares De Serjania erecta Radlk em Chrysodeixis Inclusens.*

Gelderblom Wca, Jaskiewicz R, Marasas Wfo, Thiel Pg, Horak Rm, Vleggaar R, et al., (1988). *Fumonisin - Novas Micotoxinas com Atividade Promotora de Câncer Produzidas por Fusarium moniliforme.* Appl Environ Microbiol. **54**: 1806–1811.

Guarim Neto, G., Santana, Sr, Silva, (2000). *JVB Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu.* Acta Bot. Bras.,**14**, p.327-333.

Huang, X., Yang, S., Li, B., Wang, A., Li, H., Li, X., Luo, J., Liu, F., Mu, W., (2021). *Comparative Toxicity Of Multiple Exposure Routes Of Pyraclostrobin In Adult Zebrafish (Danio Rerio).* The Science Of Total Environment **777**: 145957.

Klink, Ca, Machado, Rb, (2005). *Conservation Of The Brazilian Cerrado.* Conserv. Biol. **19** (3), 707-713.

Kumar, S., Aharwal, R. P., Shukla, H., Rajak, R. C., Sandhu, S. S., (2014). *Endophytic Fungi As A Source Of Antimicrobials Bioactive Compounds* World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences **3**:1179 -1197.

Martinelli, L. A., Naylor, R., Vitousek, P. M., Mautinha, P., (2010). *Agriculture In Brazil: Impacts, Costs, And Opportunities For A Sustainable Future.* Current Opinion In Environmental Sustainability **2** (5): 431-438.

- Pott, A., Pott, Vj, Sobrinho, AB., (2004). *Plantas úteis à certas no Pantanal*. Corumba: Editora da Embrapa, 24 p.
- Prestes, E. B., Jonsson, C. M., Castro, V. L. S. S., Paraíba, C. C. M., (2013). *Avaliação Da Toxicidade Crônica De Piraclostrobin, Epoxiconazol E Sua Mistura Em Daphnia Similis*. *Ecotoxicology And Environmental Safety* **8** (1): 113-117.
- Rodríguez, R. H., Pinto, A. C., (2014). *Constituintes Químicos E Propriedades Biológicas De Espécies Do Gênero Serjania*. *Rev. Virtual Quim.* **6** (6): 1583-1606.
- Schwartz, H. F., Singh, S. P., (2013). *Breeding Common Bean For Resistance To White Mold: a Review*. *Crop Science* **53** (5): 1832-1844.
- Shen, J., Zhao, Q., Zhang, K., Zhang, J., Huiyan Zhang, H., (2024). *Insights into inhibitory mechanisms: Unraveling the structure-activity relationship of dietary flavonoids on gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase*. *Journal of Functional Foods* **122**: 106510.
- Shiomi, H. F., Melo, I. S, Almeida-Minhoni, M. T., (2008). *Seleção De Bactérias Endofíticas Com Ação Antagônica A Fitopatógenos*. *Scientia Agraria* **9** (4): 535-538.
- Somner, G. V. Martins, S.E., Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S. Sapindaceae., (2009). *Flora Fanerogâmica Do Estado De São Paulo*, **6**, 195-256.
- Stoev Sd., (2013). *Segurança Alimentar E Aumento Do Risco De Ocorrência De Micotoxinas Em Alimentos E Rações*. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **53**: 887–901.
- Wachowska, U., Irzykowski, W., Jędryczka, M., (2018). *Agrochemicals: Effect On Genetic Resistance In Yeasts Colonizing Winter Wheat Kernels*. *Ecotoxicology And Environmental Safety* **162**: 77-84.
- Wang P, Hou T, Xu F, Luo F, Zhou H, Liu F, Xie X, Liu Y, Wang J, Guo Z, Liang X., (2022). *Discovery of Flavonoids as Novel Inhibitors of ATP Citrate Lyase: Structure-Activity Relationship and Inhibition Profiles*. *Int J Mol Sci.* **23**(18):10747.

## CAPÍTULO II

### **Avaliação mutagênica e comportamental do Extrato Metanólico de *Serjania erecta* e do fungicida piraclostrobina/epoxiconazol em *Leptodactylus labyrinthicus*.**

#### **RESUMO**

A expansão da fronteira agrícola brasileira pressiona a biodiversidade por converter áreas nativas em áreas para pastagem e agricultura. O uso de agroquímicos sintéticos em culturas agrícolas também é um risco para organismos não-alvo. Entre os biomas brasileiros, o Cerrado está sob grandes transformações no uso de terra pelas atividades agrícolas. Adicionalmente, anfíbios são o grupo de vertebrados sob maior ameaça dos efeitos das pressões antrópicas. Para o grupo, as atividades agrícolas são um dos determinantes da ameaça por causa de perda de habitat, fragmentação de habitat e utilização de agroquímicos nocivos. Portanto, pesquisas científicas sobre compostos alternativos aos agroquímicos sintéticos são relevantes para estratégias ecológicas com foco na preservação de anfíbios. No presente estudo, foi testada a seguinte hipótese: concentrações do extrato metanólico de *Serjania erecta* e do fungicida sintético piraclostrobina/epoxiconazol (P-EP) afetam a frequência de dano mutagênico, a preferência por substrato e o comportamento natatório dos girinos de *Leptodactylus labyrinthicus*. As espécies modelos do estudo, *S. erecta* e *L. labyrinthicus*, foram escolhidas com base nos seguintes dados: 1) Os extratos de *S. erecta* contêm princípios ativos com atividade antimicrobiana, 2) Os girinos de *L. labyrinthicus* são bioindicadores. Como critério de preferência por substrato, submetendo os girinos ao extrato e P-EP em experimentos controlados separados, em cada um dando a opção por substratos claro ou escuro. Por outro lado, avaliaram se os girinos apresentaram comportamento natatório parado ou nadando nos experimentos com as duas substâncias. Para investigar a frequência do dano genotóxico, aplicou-se o teste de micronúcleo e a análise de outras anomalias nucleares. Apesar de não observar mudanças significativas no comportamento natatório dos girinos, foi identificada preferência das concentrações que causaram efeito pelo lado escuro do recipiente. Tanto para o fungicida quanto para o extrato, determinadas concentrações impactaram a frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares. Assim, concluiu-se que o extrato não é uma alternativa viável para reduzir danos em girinos de *L. labyrinthicus* em relação a P-EP. Todavia, o fato de o extrato ser

biodegradável implica uma persistência menor no ambiente e a redução do risco de bioacumulação. Este achado também sugere que compostos derivados de plantas não devem ser aplicados indiscriminadamente como alternativas a agroquímicos sintéticos. O teste do micronúcleo também é um método promissor como ferramenta para avaliar o efeito de novas substâncias em organismos não alvo.

**Palavras-chave:** *Serjania*, extratos vegetais, fungicida, Rã-pimenta, Piraclostrobina, Epoxiconazol, Extrato, Cerrado, ANEs, Micronúcleo.

## ABSTRACT

The expansion of Brazilian agricultural frontier pressures the biodiversity by converting native areas into areas for pasture and agriculture. The use of synthetic agrochemicals on crops is also a risk to non-target organisms. Among the Brazilian biomes, the Cerrado is undergoing to major transformations in land use due to agricultural activities. Additionally, amphibians are the most threatened vertebrate from the effects of anthropogenic pressures. For amphibians, agricultural activities are one of the drivers of threat because of habitat loss, habitat fragmentation and harmful agrochemicals. Therefore, scientific researches into alternative compounds to synthetic agrochemicals are relevant for ecological strategies with focus in amphibian preservation. In the present study, we tested the following hypothesis: Concentrations of the methanolic extract of *Serjania erecta* and the synthetic fungicide pyraclostrobin/epoxiconazole (P-EP) affect the frequency of mutagenic damage, substrate preference and swimming behavior of *Leptodactylus labyrinthicus* tadpoles. The model species of the study, *S. erecta* and *L. labyrinthicus*, were chosen based on the following data: 1) *S. erecta* extracts contain active principles with antimicrobial activity, 2) *L. labyrinthicus* tadpoles are bioindicators. As a substrate preference criterion, the tadpoles were subjected to the extract and P-EP in separate controlled experiments, in each one giving the option of light or dark substrates. On the other hand, it was evaluated whether the tadpoles presented stationary or swimming behavior in the experiments with the two substances. To investigate genotoxic damage frequency, the micronucleus test and the analysis of other nuclear anomalies were applied. Despite no significant changes observed in the swimming behavior of the tadpoles, a preference for the dark side of the container was noted at the concentrations that caused effect. For both the fungicide and the extract, specific concentrations affected the frequency of micronuclei and other nuclear anomalies. Therefore, it was concluded that the extract is not a viable alternative to P-EP to reduce damage of *L. labyrinthicus* tadpoles. However, the fact that the extract is biodegradable implies a shorter persistence in the environment and a reduced risk of bioaccumulation. These findings also suggest that plant-derived compounds should not be applied indiscriminately as alternatives to synthetic agrochemicals. The micronucleus

test is also a promising method as a tool to evaluate the effect of new substances on non-target organisms.

**Keywords:** *Serjania*, plant extracts, fungicide, pepper frog, pyraclostrobin, epoxiconazole, extract, Cerrado, ANEs, micronucleus.

## 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é uma vasta savana com ampla biodiversidade e vegetação característica, que varia de campo limpo ao cerradão (Coutinho, 2006). O desmatamento e a expansão agrícola exercem forte pressão sobre a biodiversidade do bioma (Colli *et al.*, 2020; Correia Filho *et al.*, 2023; Machado *et al.*, 2023). Além disso, a conversão de áreas nativas do Cerrado em pastagens e monoculturas degrada o meio ambiente (Fushimi *et al.*, 2024).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, devido à posição como um dos principais polos agrícolas de plantio e produção (Moreira *et al.*, 2019; Pignati *et al.*, 2017). Em particular, regiões de fronteira agrícola no Cerrado, como o estado de Goiás, apresentam crescente aplicação de pesticidas em culturas como soja, milho e cana-de-açúcar (Teodoro *et al.*, 2023). A reprodução dos anfíbios ocorre, principalmente, durante as estações chuvosas, coincidindo com o período de plantio das safras. Nesse contexto, o uso intensivo de fungicidas pode interferir negativamente no crescimento, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência desses animais (Kopp *et al.*, 2010; Brühl *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2019).

Os anfíbios são o grupo de vertebrados sob maior ameaça (40,7%), sendo as principais causas as doenças e a perda de habitat (Luedtke *et al.*, 2023). A expansão agrícola também constitui fator significativo de ameaça às populações de anfíbios (Anunciação, 2024). Atualmente, são conhecidas mais de 8.400 espécies de anfíbios no mundo (Segalla *et al.*, 2021). O Brasil, país com a maior diversidade desse grupo, abriga 1.188 espécies, sendo 1.144 anuros (rãs, sapos e pererecas), 39 cecílias e 5 salamandras (Segalla *et al.*, 2021). Apesar dessa diversidade, ainda há lacunas no conhecimento taxonômico, com estimativas de que 25% das espécies permaneçam não descritas (Guerra *et al.*, 2020). Pesquisas sobre a exposição dos anfíbios a agroquímicos são essenciais para compreender como o ciclo de vida desses animais é afetado por tais substâncias (Awkerman *et al.*, 2024). Além disso, a busca por alternativas menos prejudiciais é fundamental para reduzir os impactos ambientais (Aioub *et al.*, 2024).

Assim, o objetivo deste capítulo é avaliar se diferentes concentrações do extrato de *Serjania erecta* e do fungicida P-EP afetam a frequência de danos mutagênicos, a

preferência por substrato e o comportamento natatório dos girinos de *Leptodactylus labyrinthicus*.

Popularmente conhecida como rã-pimenta, *L. labyrinthicus* pertence à classe Amphibia, reino Animalia, ordem Anura, família Leptodactylidae e gênero *Leptodactylus*. Essa espécie apresenta ampla distribuição no território brasileiro (Figura 1), sendo encontrada também na Argentina (Corrientes e Misiones) e no Paraguai (De la Riva, 1993; IUCN, 2024).



**Figura 1:** Mapa de distribuição da espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (Fonte: IUCN, 2024).

Até o momento, não foram constatadas grandes ameaças à rã-pimenta, amplamente distribuída e adaptável. Essa espécie pode ser utilizada como bioindicador importante (IUCN, 2024). Habita áreas abertas em savanas, florestas tropicais secas e úmidas, represas, lagoas, riachos, pântanos, áreas urbanas e solos descobertos (Neves *et al.*, 2019). A desova ocorre em corpos d'água ou em solos próximos, com os ovos depositados em ninhos de espuma e os girinos geralmente encontrados em águas paradas e sem corrente (Heyer, 2005).

A rã-pimenta é considerada de grande porte entre os anfíbios, com cerca de 18 cm de comprimento. Seu nome, *Labyrinthicus*, refere-se à presença de grandes tímpanos visíveis (membranas timpânicas) atrás dos olhos. Jovens possuem coloração variando do verde-escuro ao marrom, com manchas e pontos escuros no dorso e coloração alaranjada

ou vermelha nas coxas e laterais do corpo. Adultos são predominantemente alaranjados ou vermelhos, com faixas negras no focinho e boca (Eterovick *et al.*, 2020; IUCN, 2024).

O dimorfismo sexual é marcante nessa espécie. Machos são maiores que as fêmeas, com braços robustos e polegares especializados para agarrar as fêmeas durante a cópula (Figura 2) (Eterovick *et al.*, 2020; IUCN, 2024).



**Figura 2:** *Leptodactylus labyrinthicus* (rã-pimenta) (Fonte: HERPETO, 2024).

Neste estudo, os girinos foram escolhidos como bioindicadores por causa da alta sensibilidade a alterações ambientais, pele permeável e importância na teia alimentar. Qualquer impacto sobre eles pode desencadear desequilíbrios ecológicos, afetando toda a cadeia alimentar (Vasconcelos, 2014).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do extrato vegetal

O extrato foliar metanólico de *S. erecta* Radlk foi obtido utilizando o método descrito por Freitas (2018). Basicamente, folhas saudáveis de *S. erecta*, coletadas na cidade de Rio Verde - GO, secas em estufa, trituradas em moinho de facas e os extratos foram obtidos a partir da adição do solvente álcool metílico ao pó vegetal. Após um período de 24 horas, o material foi filtrado e rotaevaporado a 65°C, sendo posteriormente congelado e liofilizado. A exsicata foi depositada sob registro número 545 no Laboratório de Sistemática e Ecologia Vegetal do IF Goiano – Campus Rio Verde, tendo sido identificado por Dr. Germano Guarim Neto (Freitas, 2018).

## 2.2. Coleta de espécimes e aclimação

Os girinos foram coletados no município de Rio Verde-GO, na propriedade rural Cabeceira do Lageado pertencente ao Sr. Carlos Antonio Vieira Barros, localizada na GO 174 KM 05 à direita.

Para a coleta dos girinos foram utilizados EPI'S, como galochas, luvas, máscaras e puçá. Foram capturados 160 girinos de *Leptodactylus labyrinthicus*, sendo que a coleta foi feita com auxílio de puçá e os animais foram transportados ao Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal (EcotoxSA) do Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde para aclimação (Figura 3). Os girinos foram colocados em caixas plásticas retangulares de 6 L de água limpa declorada e aclimatados durante 7 dias, em temperatura ambiente, luz natural (12 h claro/12 h escuro), com aeração artificial e alimentados com ração flocada uma vez ao dia (Figura 4).





**Figura 3.** Coleta dos girinos de Rã pimenta

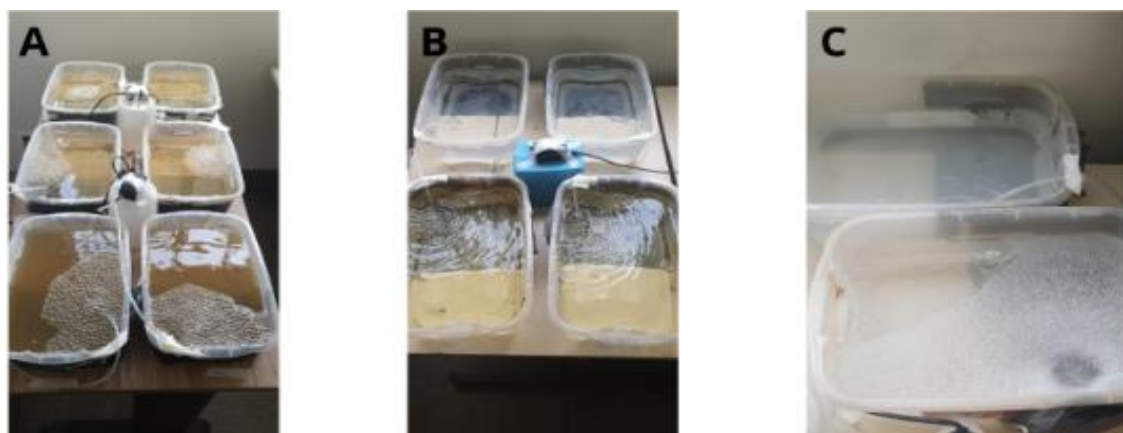


**Figura 4.** Aclimação dos Girinos.

### 2.3. Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal (ECOTOXSA), localizado no Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde (IF-GOIANO). Em cada caixa plástica retangular foram colocados 8 girinos, com os tratamentos realizados em duplicata, totalizando 16 girinos por unidade experimental. Apenas girinos no estágio 28-32 de Gosner (1960), sem membros visíveis e de tamanho semelhante, foram selecionados para os experimentos.

Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, os girinos foram expostos a seis tratamentos em quatro diferentes concentrações do extrato (31,2, 15,6, 7,8 e 3,9 mg de extrato/mL), obtidas pela diluição em álcool metílico. Foram acrescentados 25 mL do extrato de *S. erecta* em 4 L de água decolorada e foram preparados mais dois tratamentos, um sendo o controle negativo com água decolorada e o outro, o controle positivo com ciclofosfamida 40mg/L de água (Cabagna *et al.*, 2006). A ciclofosfamida foi escolhida por ser um agente comumente usado em bioensaios com girinos, capaz de induzir genotoxicidade (Singh *et al.*, 1988) (Figura 5).



**Figura 5.** (A-C) Fotos do delineamento experimental das diferentes concentrações do extrato (31,2, 15,6, 7,8 e 3,9 mg de extrato/ml) foram utilizadas e o controle negativo com água decolorada e o outro, controle positivo com ciclofosfamida.

No segundo experimento os girinos foram expostos a quatro tratamentos em diferentes concentrações do fungicida P-EP (260 g/L) / (160 g/L) (0,0023 µg/L, 0,00229 µg/L, 0,00222 µg/L e 0,00216 µg/L). Em cada tratamento foi acrescentado 1 L da solução de concentração 0,00195 µg/L, que foi considerada a concentração segura (Figura 6).



**Figura 6:** Fotos do delineamento experimental das diferentes concentrações do fungicida P-EP (260 g/L) / (160 g/L) (0,0023 µg/L, 0,00229 µg/L, 0,00222 µg/L e 0,00216 µg/L).

A avaliação do experimento teve início 24 horas após a inoculação dos agentes, avaliado pelo período de 96 horas, com medição dos parâmetros de pH, temperatura, resistividade, salinidade, condutividade, sólidos totais dissolvidos, comportamento substrato e comportamento natatório.

#### ***2.4. Caracterização do fungicida***

O fungicida com formulação piraclostrobina (260g/L) / epoxiconazol (160g/L) foi doado pelo laboratório de irrigação localizado no IF Goiano Rio Verde. Possui registro no Ministério da Agricultura e Pecuária –MAPA sob o nº 9210.

#### ***2.5. Parâmetros físico-químicos da água***

Com auxílio do aparelho multiparâmetro portátil Bante900P, foi possível a avaliação e registro da Temperatura (TEMP °C), pH, sólidos dissolvidos totais (TDS), condutividade (COD), Salinidade (SAL) e resistividade (RES). Esta análise ocorreu durante o período experimental, de modo que os parâmetros físico-químicos foram observados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

#### ***2.6. Escolha de substrato***

Em todos os tratamentos duplicados com suas respectivas concentrações foram dispostos 8 girinos para cada unidade experimental (caixa plástica retangular

transparente). A caixa foi dividida em duas partes: uma forrada com plástico polietileno preto para simular um substrato escuro e outra sem o plástico, com o fundo claro para simular o substrato claro, o objetivo foi simular as diferentes condições de substrato natural. As caixas plásticas retangulares foram acomodadas em uma sala arejada com acesso à iluminação natural para simular um habitat natural. Os registros e avaliação da escolha do substrato e a contabilização dos anfíbios dispostos eram feitas de acordo com a preferência de coloração (fundo claro ou escuro), sendo a análise realizada uma vez ao dia, a cada 24 horas durante todo o período experimental.

### **2.7. Alterações comportamentais - sobrevivência**

A vitalidade dos girinos foi registrada e analisada a cada 24 horas do experimento. Os girinos de rã-pimenta foram considerados vivos quando apresentavam algum tipo de movimento de natação após estímulo, leve com bastão de vidro (Wrubleswski *et al.* 2018).

### **2.8. Alterações comportamentais - comportamento natatório**

O teste comportamental aplicados nos girinos foi um teste de movimentação natatória adaptado de Wrubleswski *et al.* (2018), com critérios a serem avaliados e observados descritos a seguir:

(3): movimentos de natação na água igual ao grupo controle, ou seja, sem mudanças no comportamento natatório dos girinos,

(2) movimentos de natação diferentes comparados ao grupo controle, isto é, natação em círculos, vagarosa, reduzida,

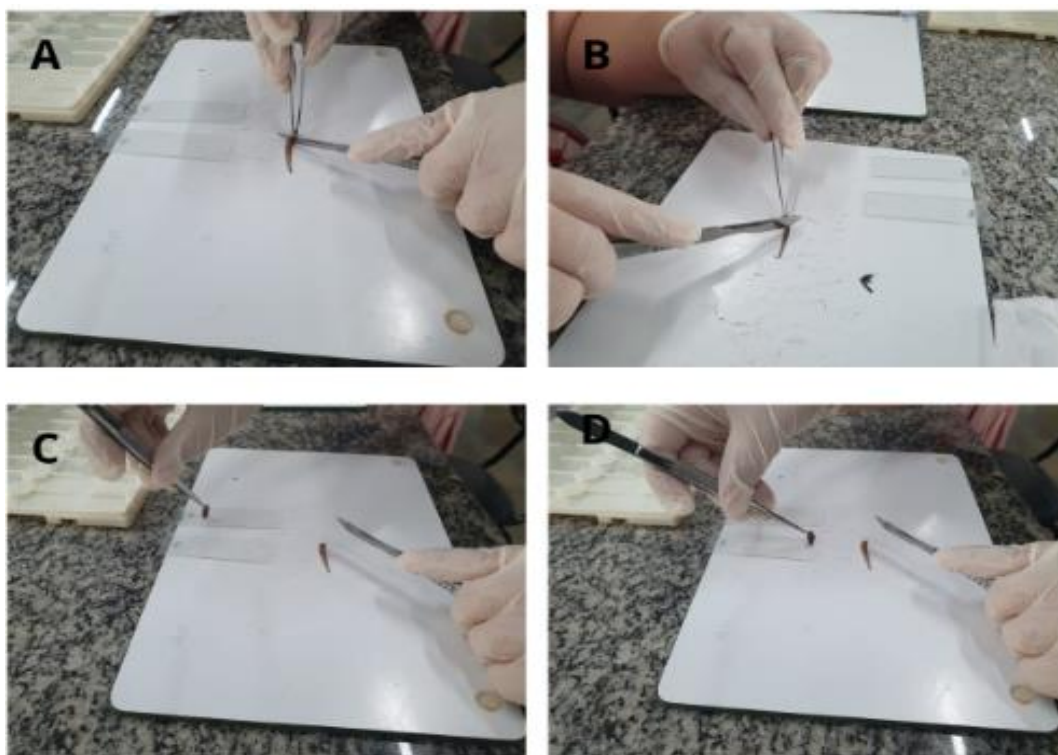
(1) movimentos de natação somente após algum estímulo em alguma região do corpo e (0) estático, mesmo após a agitação da água (estímulo), mas continua vivo.

O comportamento natatório dos indivíduos foi registrado e analisado a cada 24 h por observação qualitativa visual. A água de cada tratamento e réplicas sofreram agitação em círculos suavemente, cinco vezes com o auxílio de um bastão de vidro por 5 segundos e a atividade de natação de cada organismo em seu respectivo tratamento foi observada por 2 minutos. O padrão da atividade natatória foi considerado regular, devido os girinos não apresentarem anormalidades na natação.

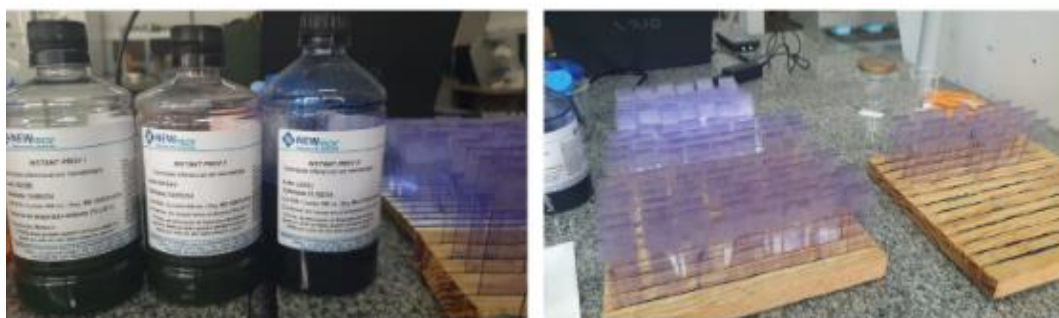
### **2.9. Teste de micronúcleo e outras anormalidades nucleares dos eritrócitos**

Os girinos de *L. labyrinthicus* foram eutanasiados com solução de lidocaína (5%) conforme normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os testes seguintes foram aplicados para análise mutagênica, utilizando a técnica de esfregaço no preparo das lâminas.

As lâminas foram manipuladas com amostras de sangue, obtidas através da secção caudal e fixadas em metanol gelado, preparou-se duas lâminas por animal (Figura 7). Em sequência foram coradas com solução de Giemsa (10%) (Pérez-Iglesias *et al.*, 2016, Borges *et al.*, 2019b, Benvindo-Souza *et al.*, 2020) e após a secagem natural (Figura 8), foram feitas a análise e execução de investigação e observação, realizadas por um único observador utilizando microscópio óptico com ampliação de 100x acoplado a uma câmera digital plotando as imagens na tela do computador, facilitando as capturas das imagens (Cabagna *et al.*, 2006, Cruz-Esquivel *et al.* 2017). O total de 1.000 células por animal foram analisadas, para detecção de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (MNs e ANEs) em rastreio de 1000 células sanguíneas por girino (Cabagna *et al.*, 2006). Todo o procedimento de eutanásia foi realizado seguindo as diretrizes do CONCEA.



**Figura 7:** Fotos (A-D) do procedimento executado para a confecção das lâminas com amostras de sangue obtidas através da secção caudal.



**Figura 8:** Fotos das lâminas coradas.

Os micronúcleos foram analisados, identificados e quantificados de acordo com os critérios descritos por Fenech (2000):

(1) ausência de sobreposição com o núcleo principal e ambos estão localizados dentro do citoplasma,

(2) a pigmentação da cor deve ser igual àquela do núcleo principal da célula, mas com tamanho menor em relação ao diâmetro médio do núcleo principal, e

(3) apresentar formato arredondado e sem ligação com o núcleo principal.

Além de micronúcleo (MN) outras anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) foram analisadas as células dos girinos, classificando-as como: micronúcleo, células binucleadas, anucleadas, brotos nucleares, segmentadas e lobadas (Benvindo-Souza *et al.*, 2020).

Ambos os dados de MN ou ANEs foram apresentados em frequência (%), sendo o total de MN ou ANEs dividido por  $10^5$  (Obiakor *et al.*, 2021).

## **2.10. Procedimentos legais**

Este estudo foi encaminhado à apreciação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO/IBAMA n.95018), e para o CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) com aprovação sob n° 4540011124.

## **2.11. Análises estatísticas**

Neste trabalho foi utilizado o teste *t* pareado com nível de significância de 0.05 para avaliar se os girinos preferem substrato claro ou escuro na presença de cada concentração do extrato ou do fungicida. O mesmo teste foi utilizado para comparar o comportamento de natação ou parado dos girinos em ambiente controlado para cada concentração de extrato ou do fungicida. Quando as amostras violaram os pressupostos

do teste *t* pareado, foi aplicada a análise de Monte Carlo para estimar a diferença entre médias com o total de 1000 randomizações (Gotelli e Ellison 2011).

Por outro lado, foram comparadas as diferenças numéricas para cada padrão de morfologia celular em cada concentração de extrato ou fungicida com o método estatístico Kruskal-Wallis a um nível de significância de 0.05. Efetuou-se todos os testes estatísticos (Teste *t* pareado, Monte Carlo, Kruskal Wallis) na plataforma R (versão 4.3.2). Especificamente, usou-se os pacotes rstatix (Kassambara 2023) e ggpubr (Kassambara 2023).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. *Parâmetros físico-químicos da água girinos de Leptodactylus labyrinthicus as diferentes concentrações de Serjania erecta Raldk*

Os parâmetros da água avaliados durante o período experimental estão descritos nas Tabelas 1 a 4. Os resultados apresentados correspondem à média de medições diárias realizadas após 24, 48, 72 e 96 horas. De maneira geral, o pH medido manteve-se levemente alcalino em todas as concentrações testadas, variando entre 8,16 e 8,59, valores compatíveis com o nível recomendado para organismos aquáticos em geral (Pollo *et al.*, 2017).

As medições de sólidos totais dissolvidos também atenderam aos critérios estabelecidos pela WHO (2022), que recomenda valores abaixo de 600 mg/L para garantir a palatabilidade da água. Em relação à condutividade, não há padrões específicos definidos para girinos (Mansano *et al.*, 2019).

As temperaturas da água permaneceram entre 25,2°C e 29,7°C ao longo do experimento. De acordo com Braga *et al.* (2001), os girinos, assim como outros anfíbios, são ectotérmicos, ou seja, a temperatura corporal depende diretamente do ambiente externo. Em outras palavras, esses animais não convertem energia química em energia térmica em níveis suficientes para manter uma temperatura corporal constante. Além disso, anfíbios apresentam elevada adaptabilidade térmica, refletindo os diferentes regimes de temperatura de seus habitats. Estudos indicam que anfíbios mantidos em temperaturas mais elevadas apresentam maior ganho de peso e completam a metamorfose em menor tempo (Braga *et al.*, 2001).

Dessa forma, as variações observadas nesses parâmetros não exerceram influência sobre os resultados obtidos na análise dos perfis comportamentais dos girinos.

**Tabela 1.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações de *Serjania erecta* Ralchk, no período de 24 horas.

| Tratamento             | Concentração do extrato | pH   | TEMP °C | RES $\Omega m$ | SAL psu | COND $\mu/s$ | TDS ppm |
|------------------------|-------------------------|------|---------|----------------|---------|--------------|---------|
| CT (-) água decolorada | -                       | 8,33 | 27,7    | 3,89           | 0,05    | 259          | 129,4   |
| CT (+) ciclofosfamida  | 40mg/L                  | 8,19 | 27,2    | 3,87           | 0,045   | 257          | 128,6   |
| <i>S.erecta</i>        | 31,2 mg/mL              | -    | -       | -              | -       | -            | -       |
| <i>S.erecta</i>        | 15,6 mg/mL              | 8,37 | 27,8    | 3,87           | 0,05    | 257          | 128,9   |
| <i>S.erecta</i>        | 7,8 mg/mL               | 8,41 | 27,6    | 3,91           | 0,04    | 255          | 127,7   |
| <i>S.erecta</i>        | 3,9 mg/mL               | 8,39 | 27,2    | 3,92           | 0,04    | 254          | 127,1   |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações de *Serjania erecta* Ralchk, no período de 48 horas.

| Tratamento             | Concentração | pH   | TEMP °C | RES $\Omega m$ | SAL psu | COND $\mu/s$ | TDS ppm |
|------------------------|--------------|------|---------|----------------|---------|--------------|---------|
| CT (-) água decolorada | -            | 8,16 | 28,9    | 3,88           | 0,04    | 253,5        | 126,4   |
| CT (+) ciclofosfamida  | 40 mg/L      | 8,21 | 28,4    | 3,96           | 0,04    | 251,5        | 126,0   |
| <i>S.erecta</i>        | 31,2 mg/mL   | -    | -       | -              | -       | -            | -       |
| <i>S.erecta</i>        | 15,6 mg/mL   | 8,38 | 29,7    | 3,95           | 0,04    | 250,0        | 125,0   |
| <i>S.erecta</i>        | 7,8 mg/mL    | 8,41 | 28,8    | 3,98           | 0,04    | 251,0        | 125,7   |
| <i>S.erecta</i>        | 3,9 mg/mL    | 8,25 | 28,5    | 3,97           | 0,04    | 251,0        | 125,7   |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

**Tabela 3.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações de *Serjania erecta* Ralchk, no período de 72 horas.

| Tratamento                | Concentração | pH   | TEMP<br>°C | RES<br>Ωm | SAL<br>psu | COND | TDS<br>ppm |
|---------------------------|--------------|------|------------|-----------|------------|------|------------|
| CT (-) água<br>decolorada | -            | 8,31 | 28,5       | 3,80      | 0,05       | 263  | 131,9      |
| CT (+)<br>ciclofosfamida  | 40 mg/L      | 8,27 | 28,0       | 3,82      | 0,05       | 262  | 131,0      |
| <i>S.erecta</i>           | 31.2 mg/mL   | -    | -          | -         | -          | -    | -          |
| <i>S.erecta</i>           | 15.6 mg/mL   | 8,59 | 28,7       | 3,89      | 0,05       | 256  | 128,3      |
| <i>S.erecta</i>           | 7.8 mg/mL    | 8,46 | 28,5       | 3,86      | 0,05       | 259  | 129,6      |
| <i>S.erecta</i>           | 3.9 mg/mL    | 8,38 | 27,9       | 3,86      | 0,05       | 258  | 129,4      |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

**Tabela 4.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações de *Serjania erecta* Ralchk, no período de 96 horas.

| Tratamento                | Concentração | pH   | TEMP<br>°C | RES<br>Ωm | SAL<br>psu | COND<br>μ/s | TDS<br>ppm |
|---------------------------|--------------|------|------------|-----------|------------|-------------|------------|
| CT (-) água<br>decolorada | -            | 8,41 | 25,9       | 3,69      | 0,05       | 270         | 135,3      |
| CT (+)<br>ciclofosfamida  | 40 mg/L      | 8,39 | 25,2       | 3,72      | 0,05       | 269         | 134,4      |
| <i>S.erecta</i>           | 31,2 mg/mL   | -    | -          | -         | -          | -           | -          |
| <i>S.erecta</i>           | 15,6 mg/mL   | 8,52 | 26,3       | 3,87      | 0,04       | 252         | 126,2      |
| <i>S.erecta</i>           | 7,8 mg/mL    | 8,54 | 26,0       | 3,75      | 0,05       | 267         | 133,5      |
| <i>S.erecta</i>           | 3,9 mg/mL    | 8,49 | 25,6       | 3,73      | 0,05       | 267         | 133,6      |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

### 3.2. Parâmetros físico-químicos da água de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina (260 g/L) / epoxiconazol (160 g/L)

Os parâmetros da água avaliados durante o período experimental estão descritos nas Tabelas 5 a 8. De maneira geral, o pH variou entre 6,95 e 8,09, apresentando valores que oscilam de neutros a levemente alcalinos, em conformidade com os níveis recomendados para organismos aquáticos em geral (Pollo *et al.*, 2017).

As temperaturas registradas permaneceram entre 24,95°C e 25,95°C, e a análise realizada anteriormente no item 3.2 aplica-se igualmente a este contexto.

As medições de sólidos totais dissolvidos atenderam às diretrizes estabelecidas pela WHO (2022), que recomenda valores inferiores a 600 mg/L para garantir a palatabilidade da água. Quanto à condutividade, não há padrões específicos definidos para girinos (Mansano *et al.*, 2019).

**Tabela 5.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 24 horas.

| Tratamento                                                | Concentração | pH   | TEMP°C | RES<br>Ωm | SAL<br>psu | COND<br>μ/s | TDS<br>ppm |
|-----------------------------------------------------------|--------------|------|--------|-----------|------------|-------------|------------|
| CT (-)                                                    | -            |      |        |           |            |             |            |
| CT (+)                                                    | +            |      |        |           |            |             |            |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00216 μg/L | 7,89 | 25,5   | 4,07      | 0,04       | 245         | 122,2      |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00222 μg/L | 7,86 | 25,4   | 4,08      | 0,04       | 245         | 122,8      |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,0023 μg/L  | 7,63 | 25,5   | 4,05      | 0,04       | 242         | 123,2      |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00229 μg/L | 7,82 | 25,5   | 4,15      | 0,04       | 243         | 122,9      |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

**Tabela 6.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 48 horas.

| Tratamento                                                | Concentração      | pH   | TEMP °C | RES<br>$\Omega$ m | SAL<br>psu | COND<br>$\mu$ /s | TDS<br>ppm |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|------|---------|-------------------|------------|------------------|------------|
| CT (-)                                                    | -                 |      |         |                   |            |                  |            |
| CT (+)                                                    | +                 |      |         |                   |            |                  |            |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00216 $\mu$ g/L | 7,47 | 25,9    | 4,34              | 0,03       | 226,5            | 115,4      |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00222 $\mu$ g/L | 7,35 | 26,0    | 4,28              | 0,03       | 233,0            | 116,6      |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,0023 $\mu$ g/L  | 6,95 | 25,5    | 4,24              | 0,04       | 234,5            | 117,5      |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00229 $\mu$ g/L | 7,29 | 25,3    | 4,44              | 0,03       | 226,5            | 113,7      |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

**Tabela 7.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 72 horas.

| Tratamento                                                | Concentração | pH   | TEMP°C | RES<br>Ωm | SAL<br>psu | COND<br>μ/s | TDS<br>ppm |
|-----------------------------------------------------------|--------------|------|--------|-----------|------------|-------------|------------|
| CT (-)                                                    | -            |      |        |           |            |             |            |
| CT (+)                                                    | +            |      |        |           |            |             |            |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00216 μg/L | 7,69 | 25,3   | 4,2       | 0,04       | 237,5       | 118,95     |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00222 μg/L | 7,81 | 24,3   | 4,2       | 0,04       | 239,5       | 119,65     |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,0023μg/L   | 7,57 | 25,6   | 4,1       | 0,04       | 241,5       | 122,25     |
| piraclostrobina<br>(260g/L) /<br>epoxiconazol<br>(160g/L) | 0,00229μg/L  | 7,77 | 25,0   | 4,2       | 0,04       | 237,5       | 118,90     |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

**Tabela 8.** Parâmetros avaliados na água da exposição de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* às diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L), no período de 96 horas.

| Tratamento                                       | Concentração      | pH   | TEMP °C | RES $\Omega$ m | SAL psu | COND $\mu$ /s | TDS ppm |
|--------------------------------------------------|-------------------|------|---------|----------------|---------|---------------|---------|
| CT (-)                                           | -                 |      |         |                |         |               |         |
| CT (+)                                           | +                 |      |         |                |         |               |         |
| piraclostrobina (260g/L) / epoxiconazol (160g/L) | 0,00216 $\mu$ g/L | 8,09 | 25,65   | 4,31           | 0,03    | 228,5         | 115,4   |
| piraclostrobina (260g/L) / epoxiconazol (160g/L) | 0,00222 $\mu$ g/L | 8,07 | 25,55   | 4,25           | 0,03    | 235,0         | 117,4   |
| piraclostrobina (260g/L) / epoxiconazol (160g/L) | 0,0023 $\mu$ g/L  | 7,85 | 25,85   | 4,18           | 0,04    | 238,5         | 119,6   |
| piraclostrobina (260g/L) / epoxiconazol (160g/L) | 0,00229 $\mu$ g/L | 7,99 | 25,25   | 4,30           | 0,03    | 233,5         | 116,9   |

CT (controle), pH (potencial hidrogeniônico), TEMP (temperatura), RES (resistência), SAL (Salinidade), COND (condutividade), TDS (total de sólidos dissolvidos).

### **3.3. Alterações comportamentais - sobrevivência de girinos de *L. labyrinthicus* em diferentes concentrações de extrato metanólico de *S. erecta* Ralbk**

Todos os girinos morreram quando submetidos à concentração de extrato metanólico de *S. erecta* da ordem de 31,2 mg/ml durante o registro de 24 horas.

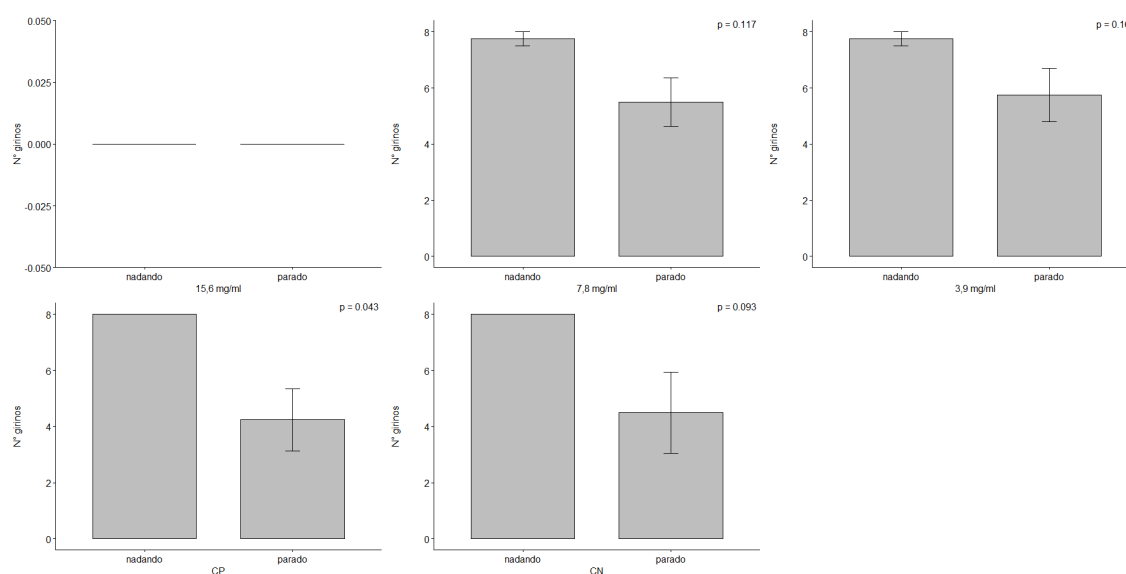
Não foi observada natação incomum por parte dos girinos durante todo o experimento analisado no período de 96 horas e concentrações testadas.

### **3.4. Alterações comportamentais - sobrevivência de girinos de *L. labyrinthicus* em diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina (260 g/L) / epoxiconazol (160 g/L)**

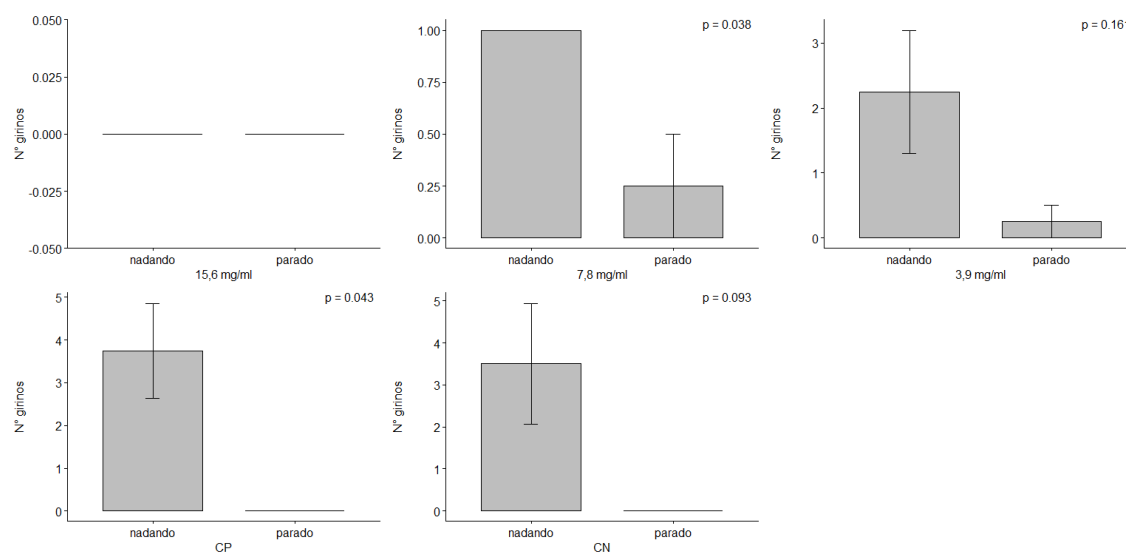
Não foi observada natação incomum por parte dos girinos durante todo o experimento analisado no período de 96 horas e concentrações testadas.

### 3.5. Alterações comportamentais - comportamento natatório de girinos de *L. labyrinthicus* em diferentes concentrações de extrato metanólico de *S. erecta* Raldk

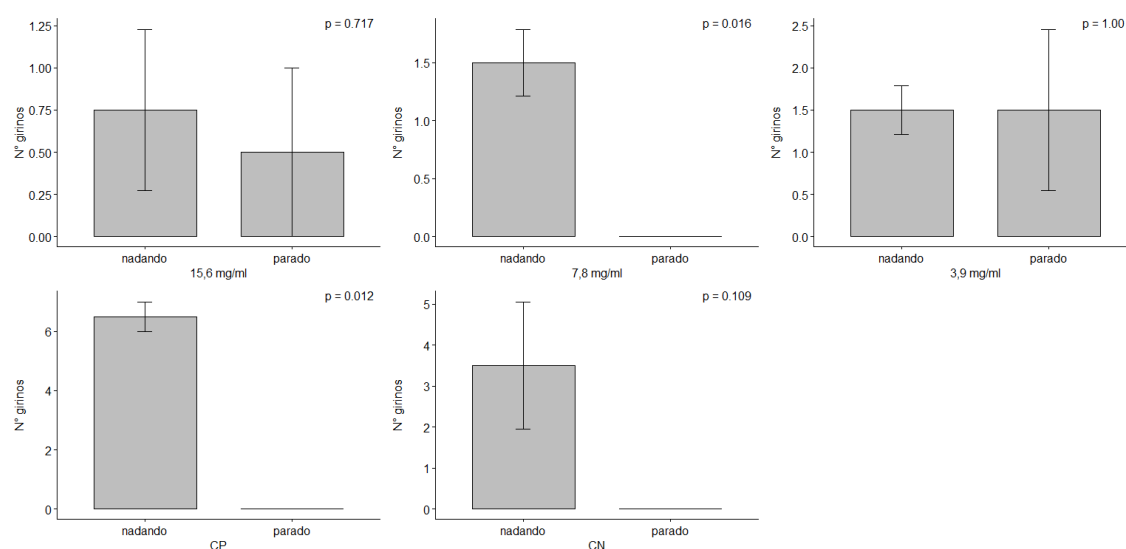
Quando analisado o comportamento natatório dos girinos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *S. erecta*, observou-se efeitos significativos neste parâmetro na réplica 1 (CP,  $p = 0.04301$ ), réplica 2 (CP e amostra de 7,8 mg/ml,  $p = 0.04301$  e  $p = 0.038$ , respectivamente), réplica 3 (CP e 7,8 mg/ml,  $p = 0.012$  e  $p = 0.016$ , respectivamente) e réplica 4 (CP e 7,8 mg/ml,  $p = 0.01$  e  $p = 0.015$ , respectivamente), conforme mostrado nas figuras 9 a 12. As réplicas 1 e 2 dizem respeito às amostras em que não houve agitação. Já as réplicas 3 e 4 remetem às amostras com agitação.



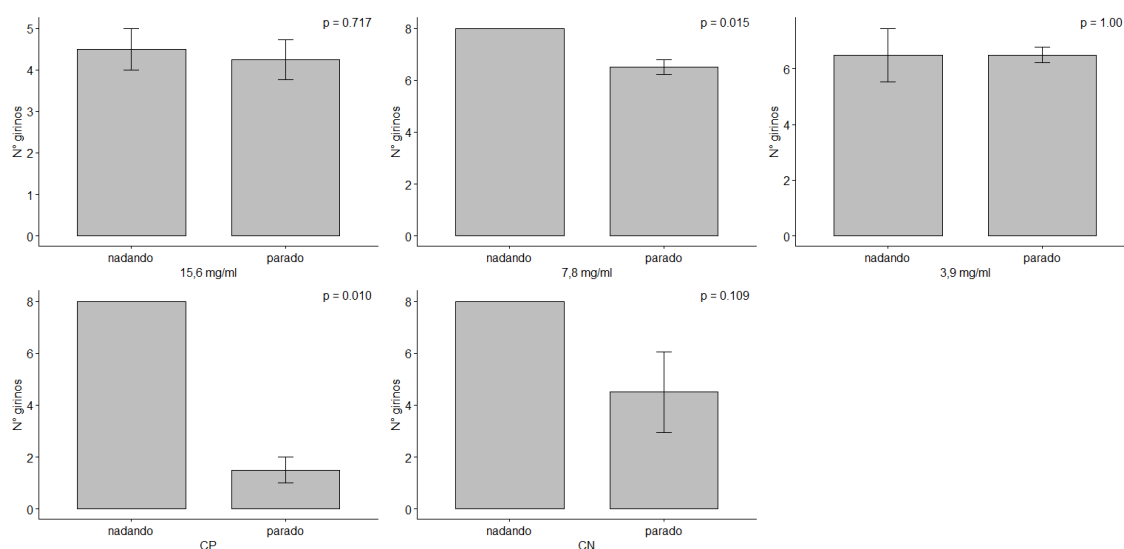
**Figura 9.** Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 1.



**Figura 10.** Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 2.



**Figura 11.** Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento Natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 3.



**Figura 12.** Efeito do extrato metanólico de *Serjania erecta* sobre o comportamento natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 4.

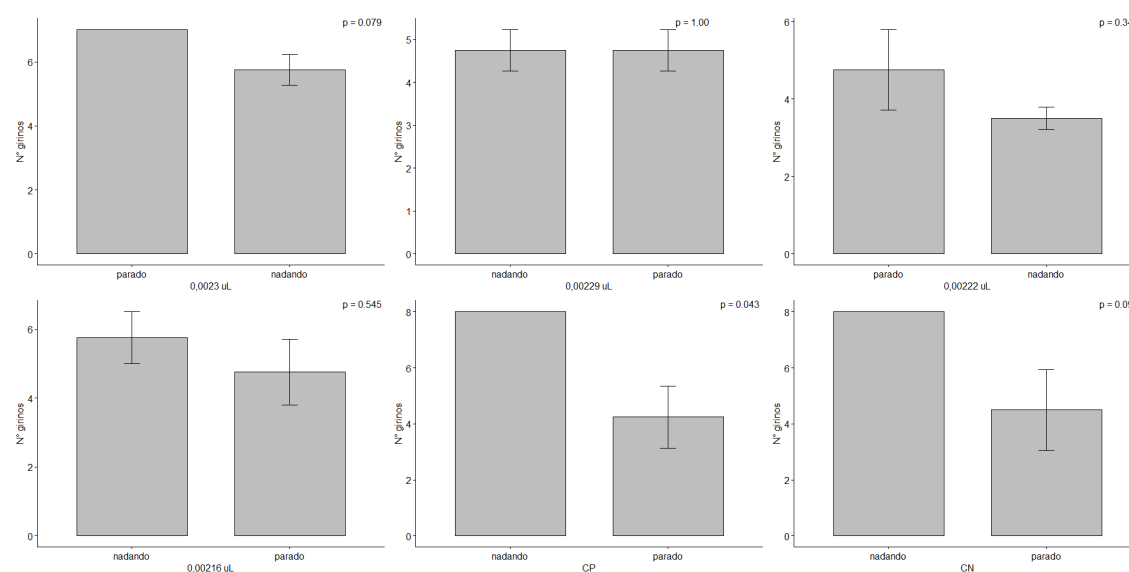
As alterações comportamentais observadas, de pequena magnitude, podem estar relacionadas às concentrações utilizadas, que possivelmente não foram suficientes para provocar mudanças comportamentais significativas em curto período. Testes comportamentais integrados a experimentos toxicológicos são fundamentais para compreender os possíveis efeitos de xenobióticos sobre comunidades biológicas. As concentrações desses compostos que contaminam o meio ambiente geralmente são baixas e, embora possam não causar a morte imediata dos indivíduos, podem alterar o comportamento, tornando-os mais vulneráveis à predação (Peltzer *et al.*, 2013; Perez Iglesias, 2015).

O uso de pesticidas, como fungicidas, herbicidas e inseticidas, pode resultar em contaminação ambiental e induzir alterações comportamentais nos organismos expostos (Peltzer *et al.*, 2013).

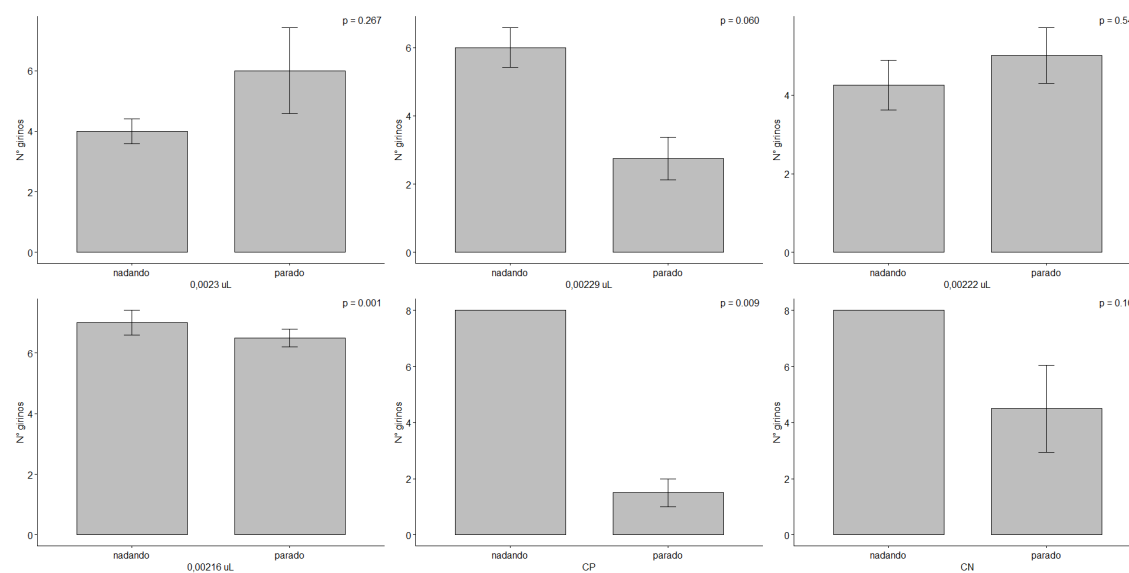
### 3.6. Alterações comportamentais - comportamento natatório de girinos de *Leptodactylus labyrinthicus* em diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina (260 g/L) / epoxiconazol (160 g/L)

Para a avaliação do comportamento natatório na presença do fungicida, nas seguintes réplicas para houve efeitos significativos: réplica 1 (CP,  $p = 0.04301$ ), réplica 2 (CP e amostra de 0,00216 uL,  $p = 0.009$  e  $p = 0.001$ , respectivamente), réplica 3 (CP,  $p = 0.043$ ) e réplica 4 (CP e amostra 0,00216,  $p = 0.01$  e  $p = 0.001$ , respectivamente),

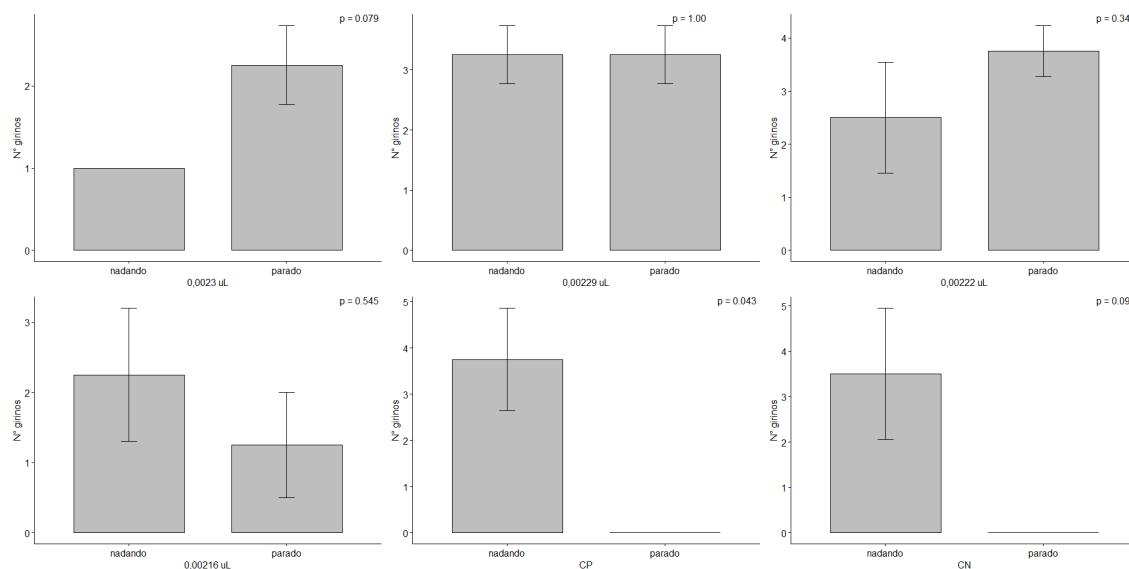
conforme pode ser visto nas figuras 13 a 16. As réplicas 1 e 2 dizem respeito às amostras em que não houve agitação. Já as réplicas 3 e 4 remetem às amostras com agitação.



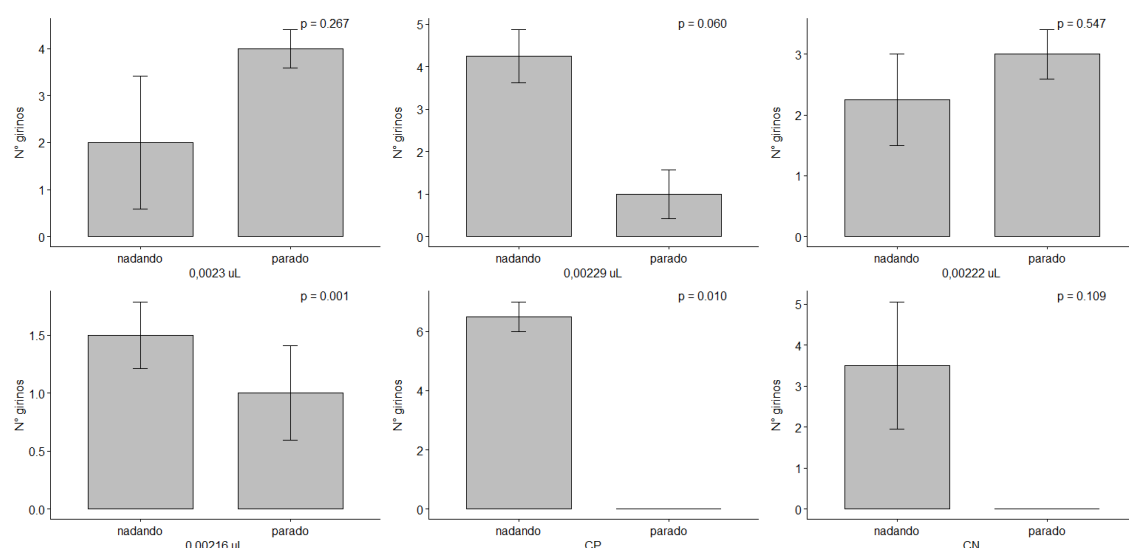
**Figura 13.** Efeito do do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 1.



**Figura 14.** Efeito do do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 2.



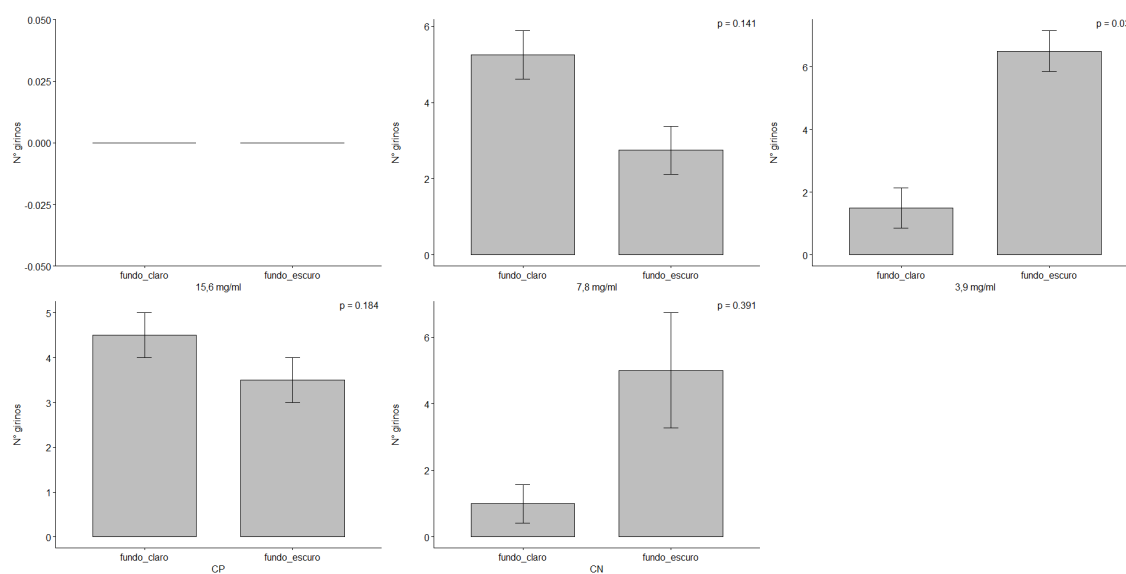
**Figura 15.** Efeito do do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 3.



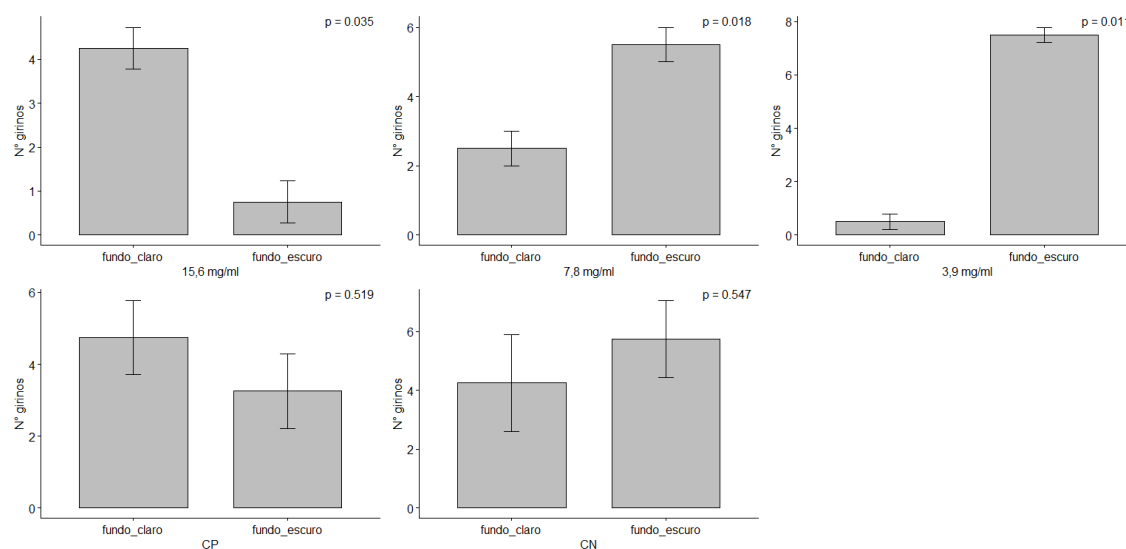
**Figura 16.** Efeito do do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre o comportamento natatório de *Leptodactylus labyrinthicus* na réplica 4.

### 3.7. Análise comportamental – escolha do substrato.

Foram encontradas diferenças significativas para preferência dos girinos por substratos escuros nas seguintes concentrações do extrato metanólico de *S. erecta*: 3,9 mg/mL (Figura 17), 3,9 mg/mL e 7,8 mg/mL (Figura 18).

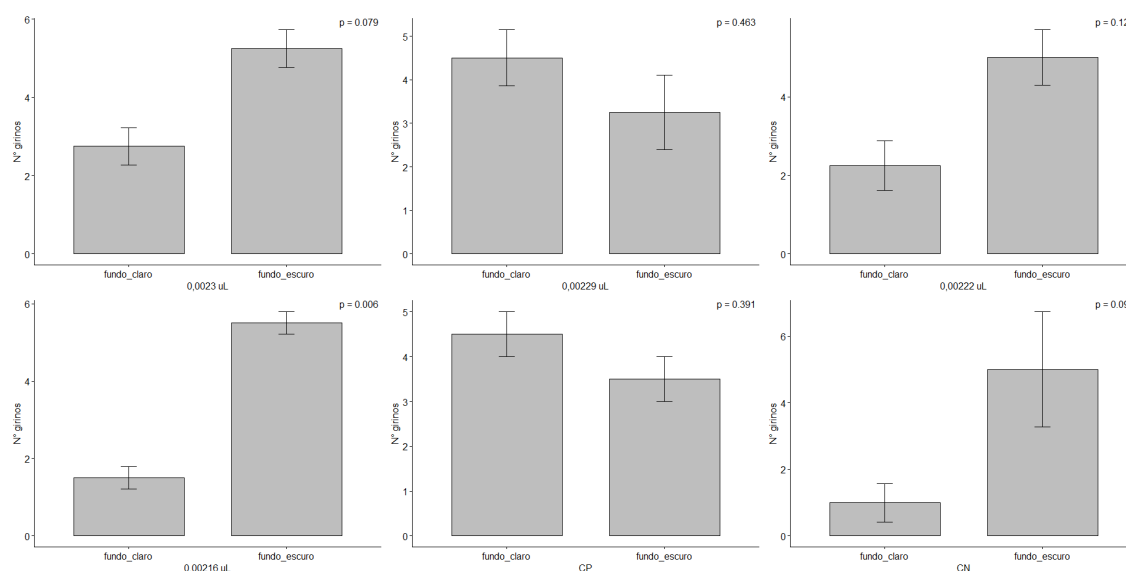


**Figura 17.** Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 1).

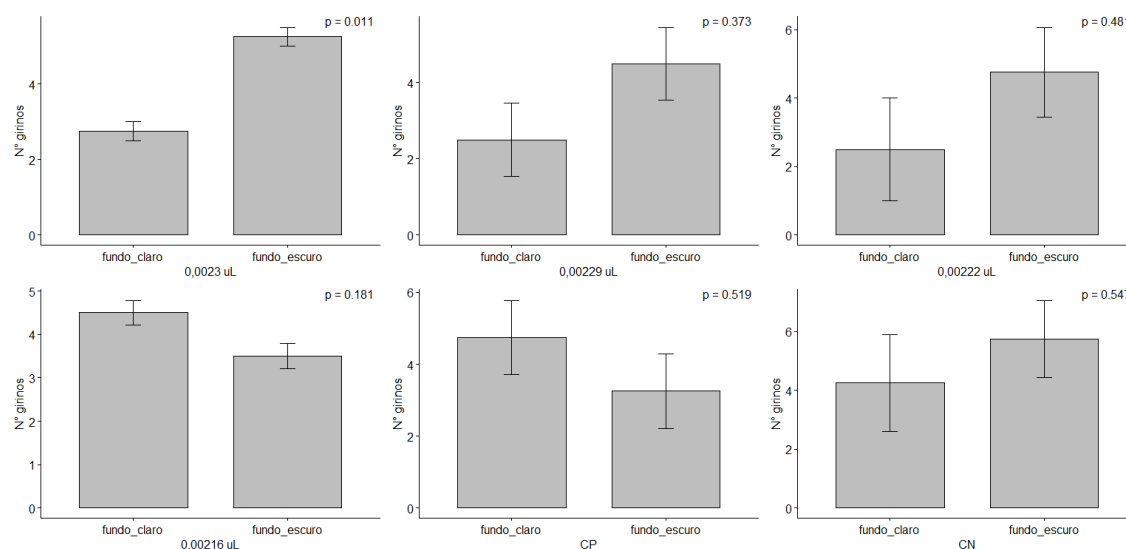


**Figura 18.** Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 2).

Por outro lado, nos testes para fungicida os resultados significativos para preferência entre substrato claro e escuro ocorreram nas concentrações 0,00216 uL ( $p = 0.006$ , réplica 1) e 0,0023 uL ( $p = 0.011$ , réplica 2), figuras 19 e 20, respectivamente.



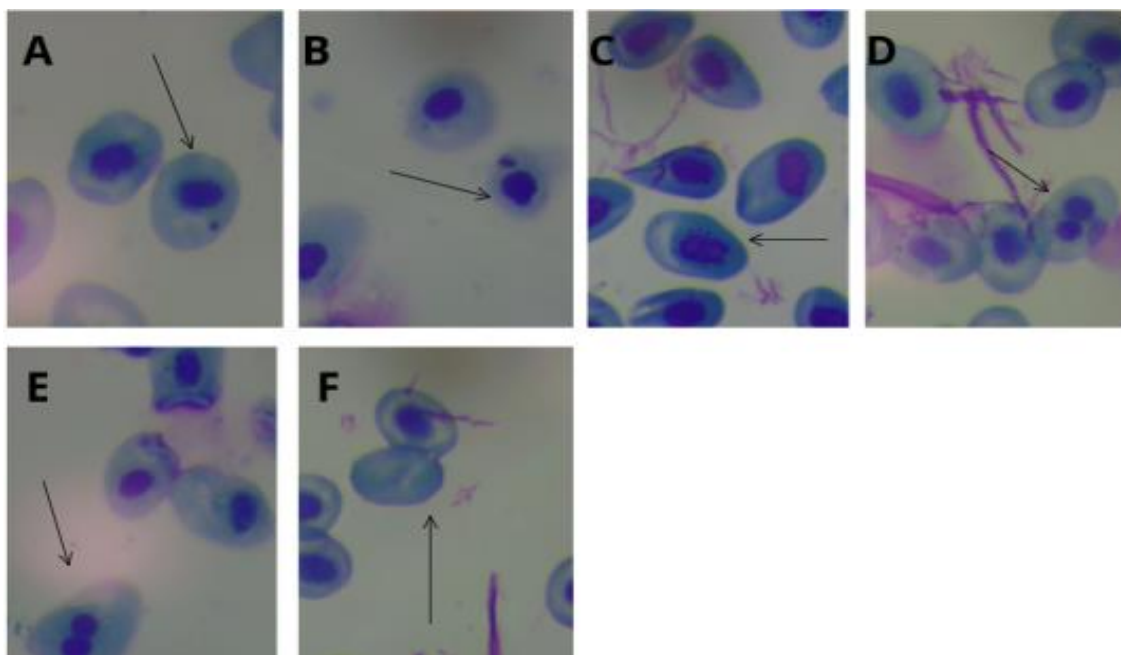
**Figura 19.** Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 1).



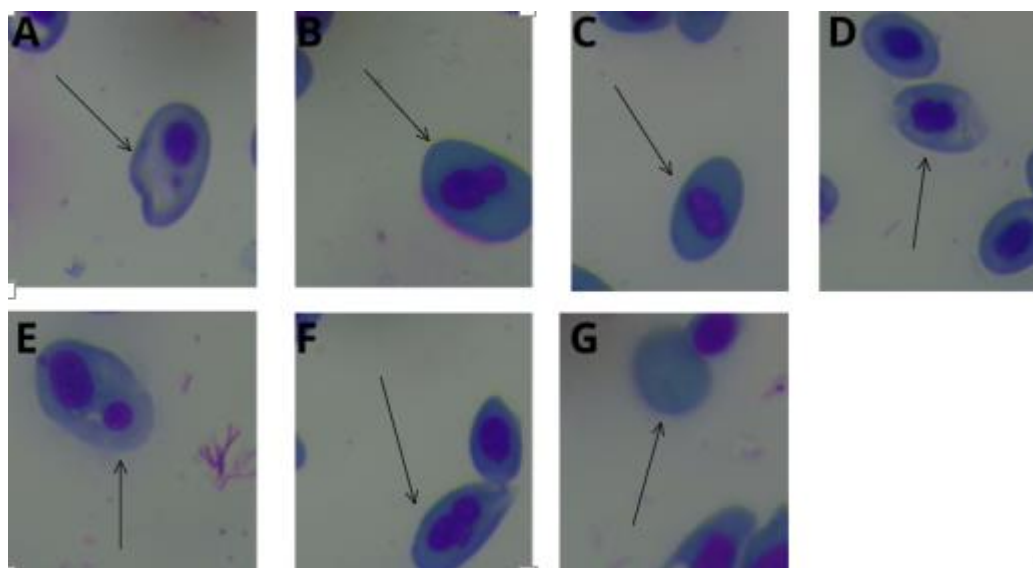
**Figura 20.** Preferência dos girinos por substrato claro ou escuro na presença de extrato (réplica 2).

### 3.8. Teste de micronúcleo e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs)

Em relação às doses aplicadas do fungicida foi observado efeito significativo em 5 variáveis, micronúcleo, broto nuclear, núcleo lobado, núcleo segmentado e célula anucleada, como pode ser visto nas figuras 21 e 22.

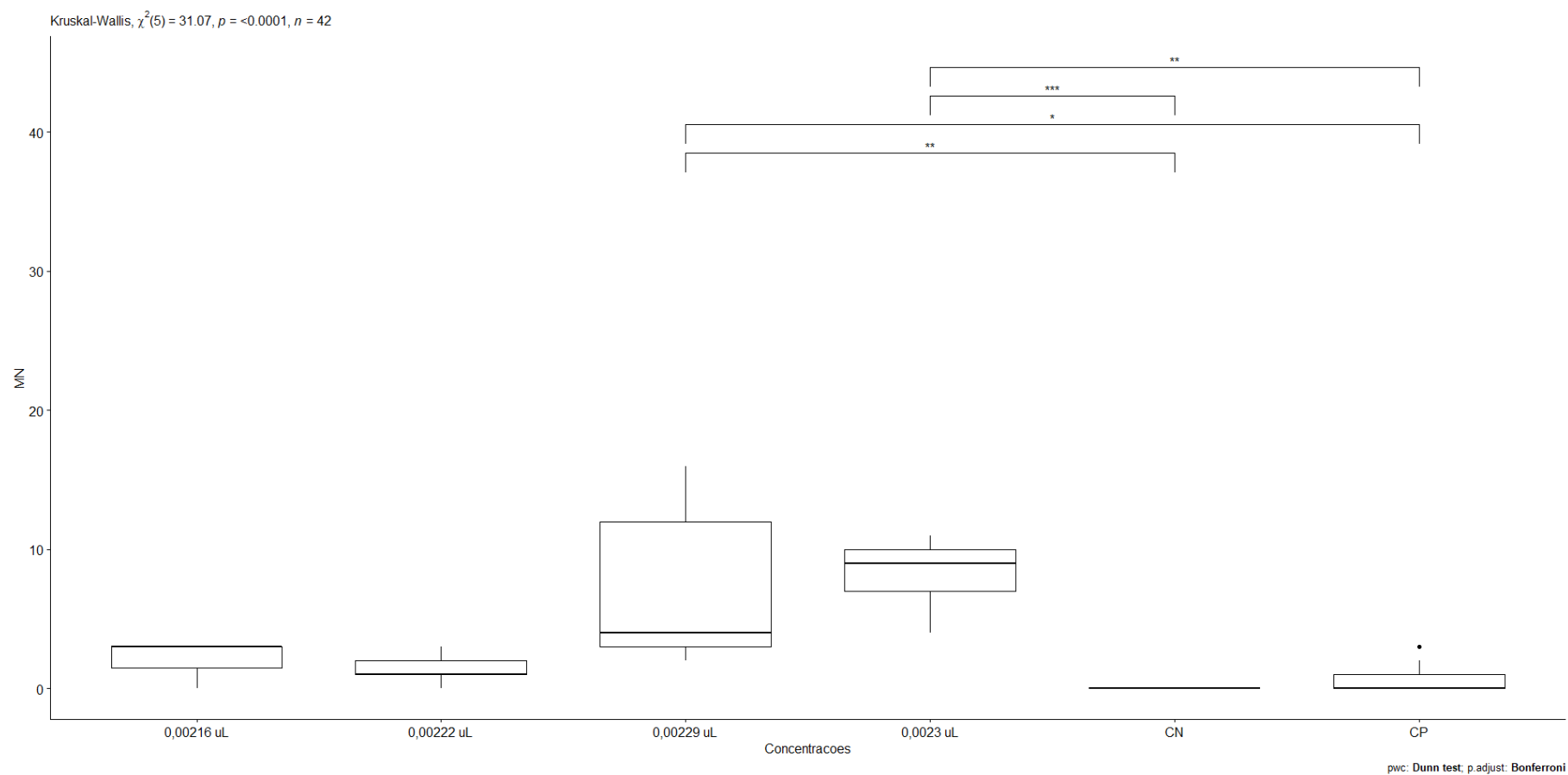


**Figura 21.** Fotos das células de girinos *Leptodactylus labyrinthicus*, expostas a diferentes concentrações de extrato *Serjania erecta*. (A) célula micronúcleo, (B) broto nuclear, (C) lobada, (D) e (E) binucleada (F) anucleada.

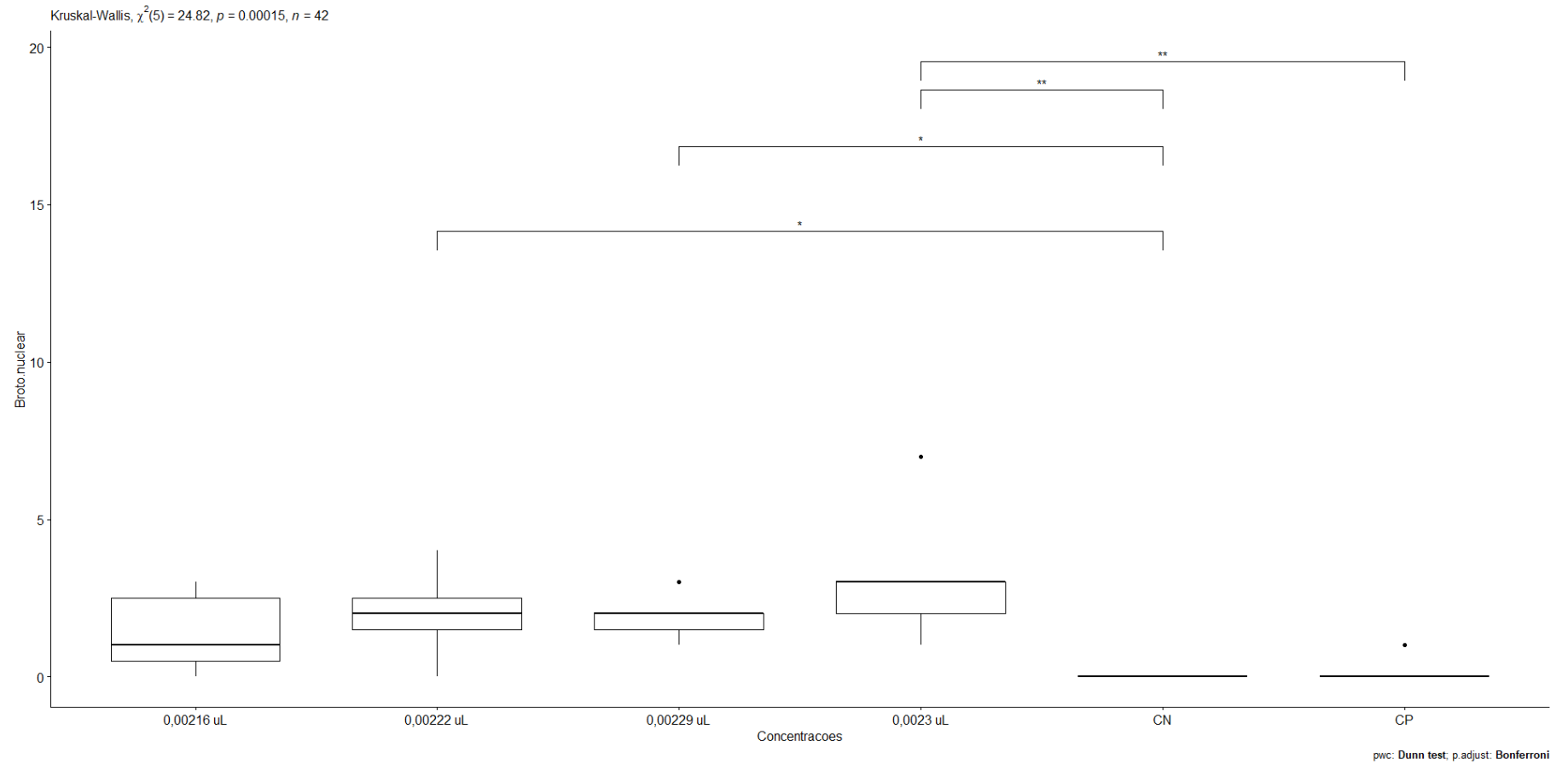


**Figura 22.** Fotos das células de girinos *Leptodactylus labyrinthicus*, expostas a diferentes concentrações do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L). (A) célula micronúcleo, (B) broto nuclear, (C) e (D) lobadas, (E) e (F) binucleada e (G) anucleada.

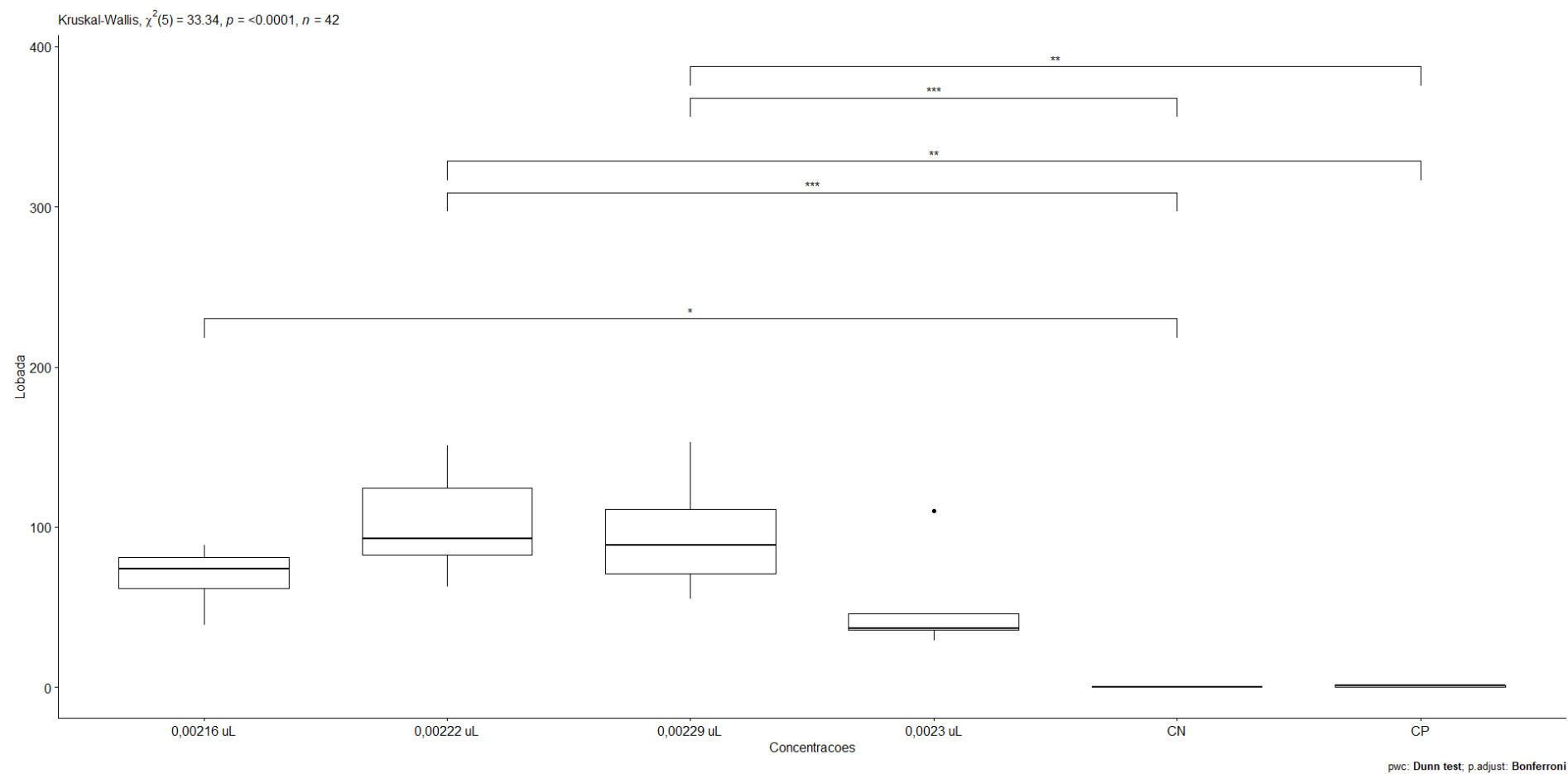
Para micronúcleo ( $X^2 = 31.1$ ,  $p = 0.00000906$ ) apenas duas doses não causaram efeito (0,00216  $\mu$ L e 0,00222  $\mu$ L). Para broto nuclear ( $X^2 = 24.8$ ,  $p = 0.000151$ ) apenas uma dose não causou efeito (0,00216  $\mu$ L). Para núcleo lobado ( $X^2 = 33.3$ ,  $p = 0.00000322$ ) todas as doses aplicadas demonstraram efeito. Para núcleo segmentado ( $X^2 = 25.5$ ,  $p = 0.00011$ ) apenas uma dose não causou efeito (0,00216  $\mu$ L). Para células anucleadas ( $X^2 = 23.7$ ,  $p = 0.000244$ ) foi encontrado efeito em todas as doses aplicadas. (Figura 23, 24, 25, 26 e 27).



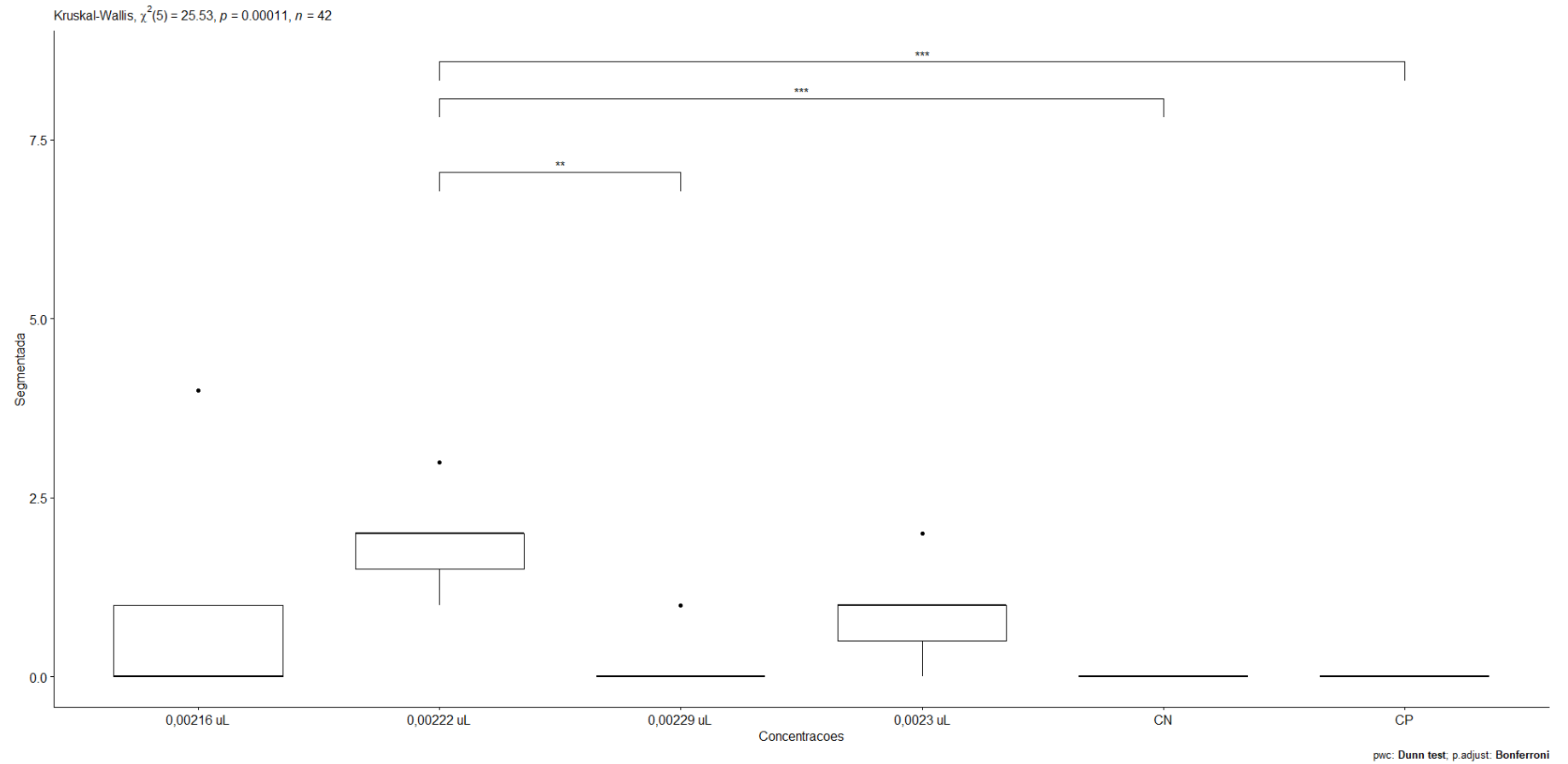
**Figura 23.** Efeito do fungicida com P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável micronúcleo em *Leptodactylus labyrinthicus*.



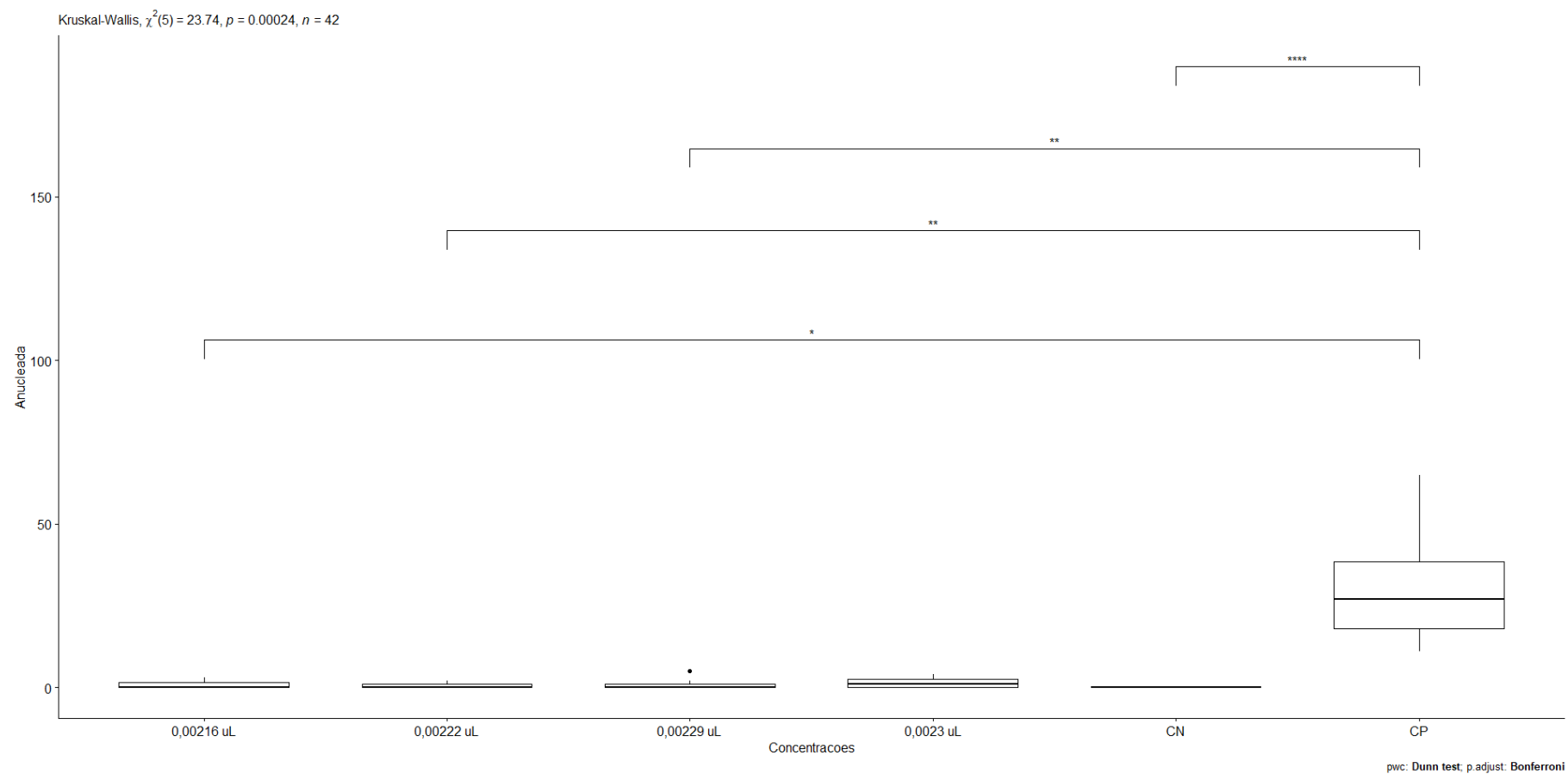
**Figura 24.** Efeito do fungicida com P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável broto nuclear em *Leptodactylus labyrinthicus*.



**Figura 25.** Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável núcleo lobado em *Leptodactylus labyrinthicus*.

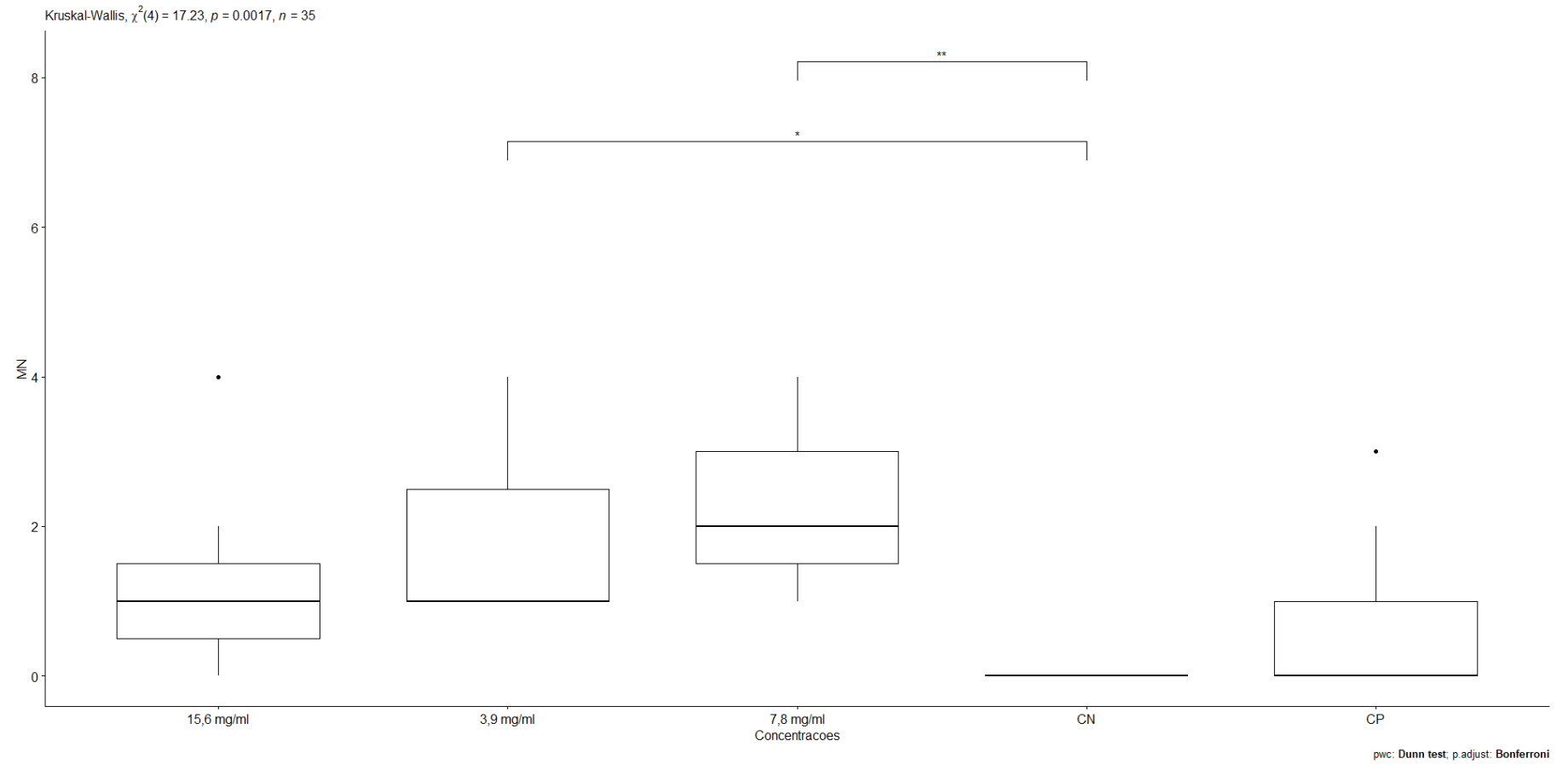


**Figura 26.** Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável núcleo segmentado em *Leptodactylus labyrinthicus*.

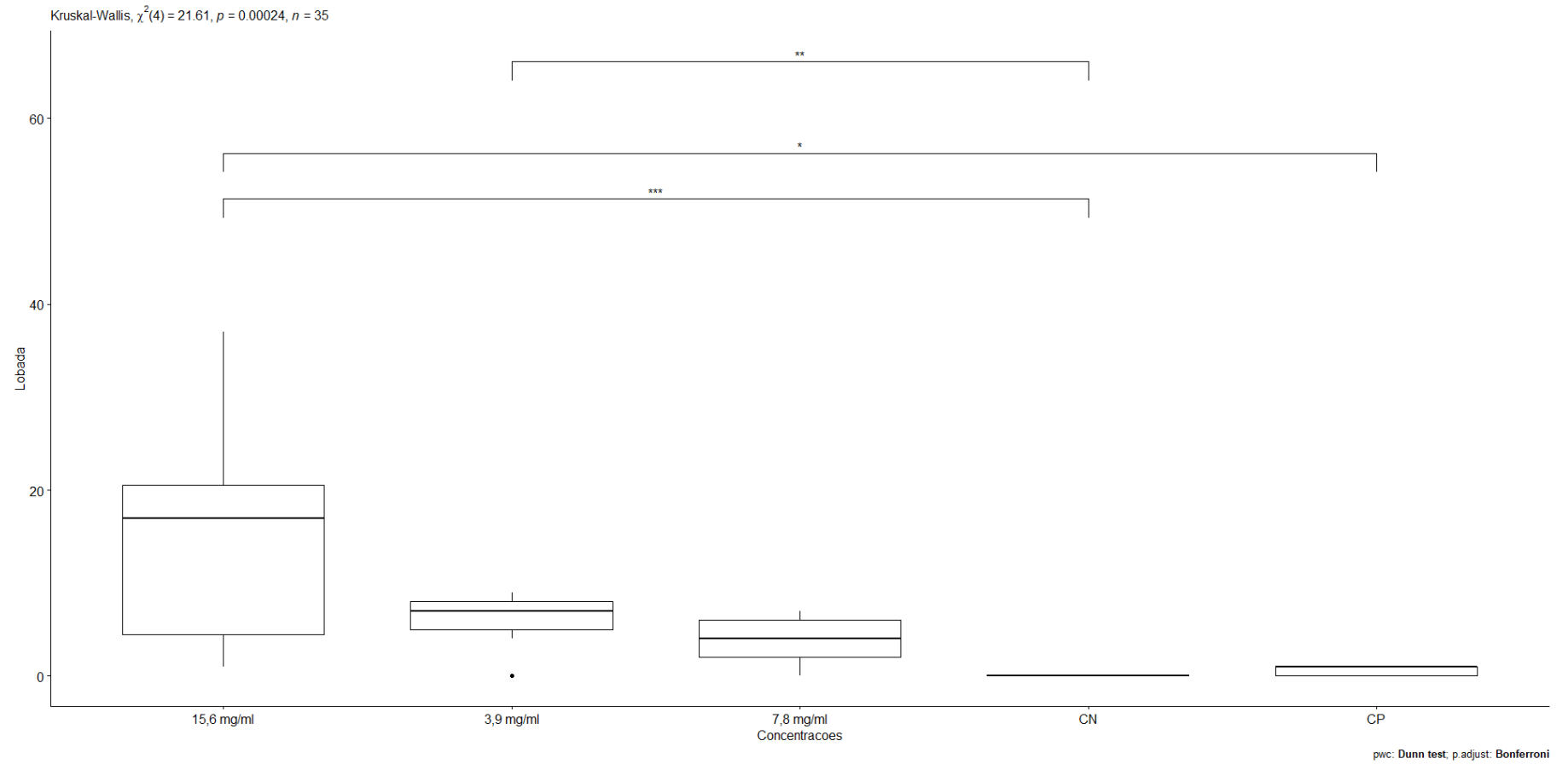


**Figura 27.** Efeito do fungicida com formulação P-EP (260g/L) / (160g/L) sobre a variável células das anucleadas em *Leptodactylus labyrinthicus*.

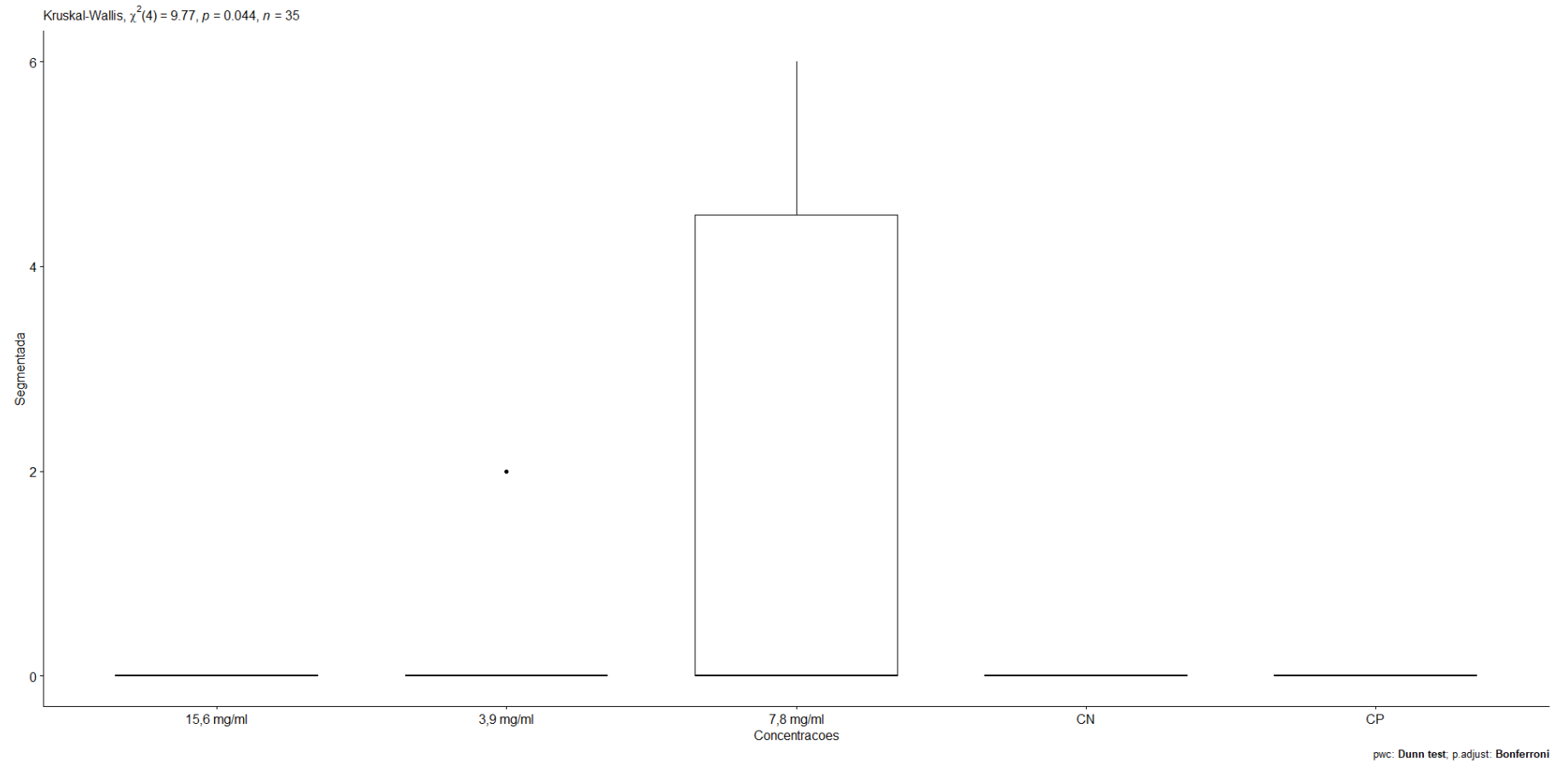
No que diz respeito às doses de extrato metanólico de *S. erecta*, foi observado efeito significativo em 4 variáveis, micronúcleo, núcleo lobado, núcleo segmentado e célula anucleada. Para micronúcleo ( $X^2 = 17.2$ ,  $p = 0.00174$ ) duas doses não causaram efeito (15,6 mg/ml e CP). Para núcleo lobado ( $X^2 = 21.6$ ,  $p = 0.00024$ ) todas as doses apresentaram efeito. Para núcleo segmentado ( $X^2 = t = 9.77$ ,  $p = 0.0444$ ) apenas uma dose (3,9 mg/ml) demonstrou efeito. Para células Anucleadas ( $X^2 = 26.2$ ,  $p = 0.0000283$ ) todas as doses apresentaram efeito. (Figuras 28 a 31).



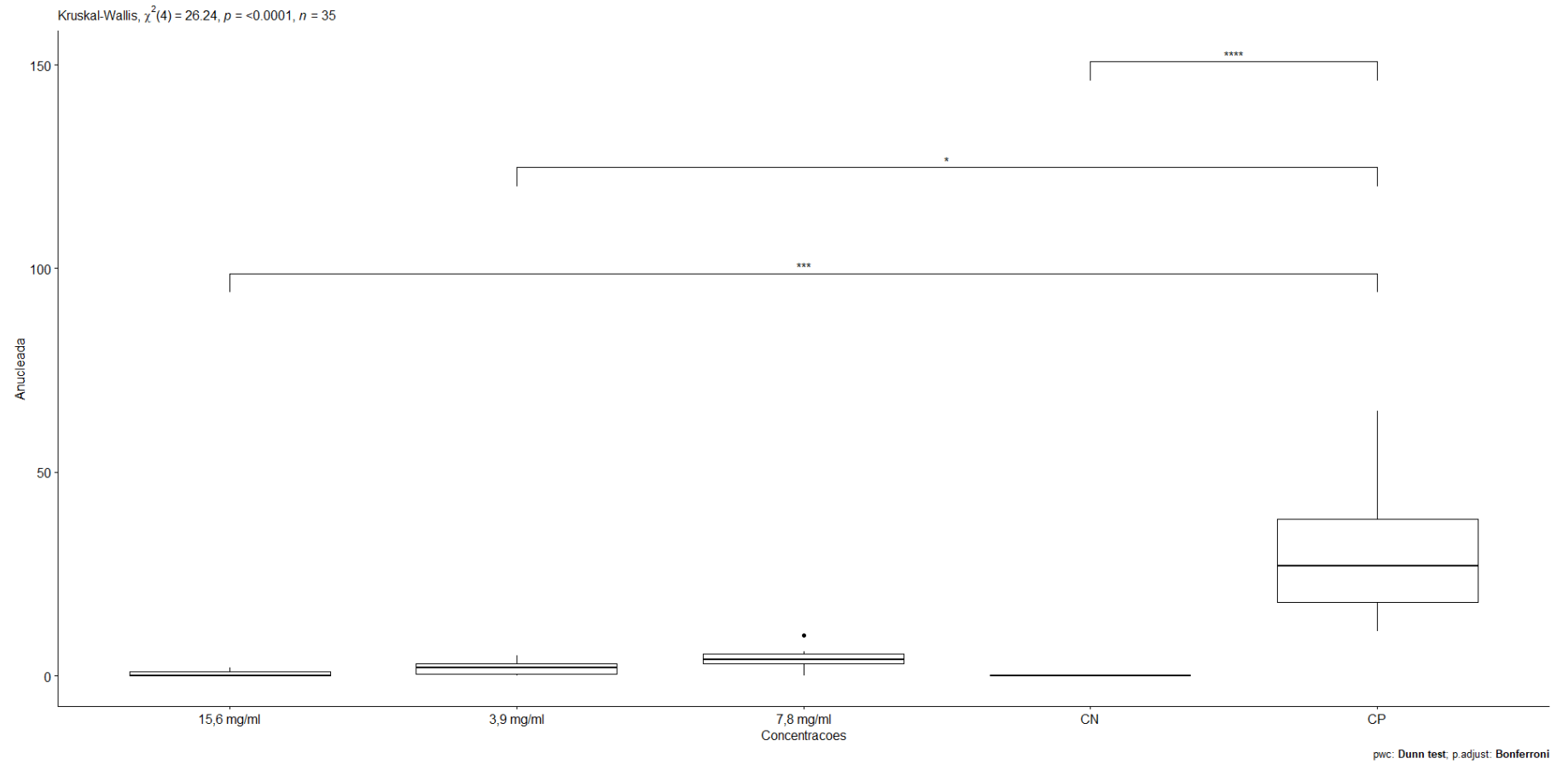
**Figura 28.** Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável micronúcleo em *Leptodactylus labyrinthicus*.



**Figura 29.** Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável núcleo lobado em *Leptodactylus labyrinthicus*.



**Figura 30.** Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável núcleo segmentado em *Leptodactylus labyrinthicus*.



**Figura 31.** Efeito do extrato de metanólico de *Serjania erecta* sobre a variável células anucleadas em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Na maioria das variáveis investigadas por meio do teste de MN e AENs, foi possível observar os efeitos das doses do fungicida e do extrato metanólico de *S. erecta*. Esses resultados demonstram que ambas as substâncias possuem potencial citotóxico e causaram danos genotóxicos nos organismos testados. Entre as doses do extrato, apenas a concentração de 15,6 mg/mL não induziu a formação de micronúcleos, sugerindo que essa concentração apresenta potencial para ser utilizada em futuros experimentos. É importante destacar que as doses empregadas neste estudo foram superiores às utilizadas em experimentos com fungos fitopatogênicos.

Xenobióticos são frequentemente descartados no meio ambiente em razão de atividades humanas, e essas substâncias podem impactar diretamente a biodiversidade. Nesse contexto, testes de genotoxicidade, como o do micronúcleo, constituem ferramentas úteis para avaliar os efeitos de novas substâncias em organismos vivos (Udroiu *et al.*, 2015; Fernando *et al.*, 2016; Benvindo-Souza *et al.*, 2020). O surgimento de micronúcleos e outras anomalias nucleares podem ser provocados por agentes que causam lesões no material genético, resultando na fragmentação de cromossomos (Pollo *et al.*, 2015; Udroiu *et al.*, 2015).

O efeito genotóxico de pesticidas utilizados em práticas agrícolas sobre espécies não alvo, como os anuros, já foi demonstrado em estudos experimentais (Pollo *et al.*, 2015; Natale *et al.*, 2018; Borges *et al.*, 2019 a,b). No entanto, trabalhos que evidenciem efeitos genotóxicos de metabólitos do gênero *Serjania* ainda são escassos na literatura. Há, contudo, registros de atividades inibitórias em organismos vivos, como microrganismos, parasitas, insetos e peixes, reforçando o potencial citotóxico desses metabólitos (Hernandez *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2021; De Freitas *et al.*, 2022).

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato foliar metanólico de *S. erecta* demonstrou causar efeitos genotóxicos em *L. labyrinthicus*, evidenciando o potencial citotóxico. Pesticidas botânicos constituem uma alternativa interessante ao uso de pesticidas tradicionais, pois se degradam com relativa facilidade, contribuindo para a redução dos danos ambientais. No entanto, os mecanismos de ação e os efeitos dessas substâncias sobre diferentes organismos precisam ser cuidadosamente avaliados, pelo fato de serem produtos de origem natural, não implicando necessariamente segurança. O teste de micronúcleo demonstrou ser uma

ferramenta promissora para a avaliação do efeito de novas substâncias em organismos não alvo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aioub, A.A.A., Ghosh, S., AL-Farga, A., Khan, A.N., Bibi, R., Elwakeel, A.M., Nawaz, A., Sherif, N.T., Elmasry, S.A., Ammar, E.E., (2024). *Back to the origins: biopesticides as promising alternatives to conventional agrochemicals*. Eur J Plant Pathol, **169**: 697–713.

Anunciação, P.R., Valencia-Zuleta, A., Signorelli, L., Martins, M., Bastos, R.P., Bataus, Y., Guidorizzi, C.E., (2024). *Amphibian conservation status in Brazil: Spatial patterns, threats, and challenges*. Journal for Nature Conservation (79):126611.

Awkerman, J.A., Purucker, S.T., Raimondo, S., Oliver, L., (2024). Long-term, landscape-level assessment of aquatic pesticide exposure to identify amphibian ontological traits affecting vulnerability. Integrated Environmental Assessment and Management (20):5.

Benvindo-Souza, M., Oliveira, E.A.S., Assis, R.A., Santos, C.G.A., Borges, R.E., Silva, D.M., Santos, L.R.S., (2020). *Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths*. Chemosphere, **240**: 124910.

Borges, R.E., Santos, L.R.S., Assis, R.A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., Oliveira, C., (2019a). *Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans*. Environmental Science and Pollution Research, **26**: 2623–2634.

Borges, R.E., Santos, L.R.S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R.S., Assis, R.A., Oliveira, C., (2019b). *Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **77**: 22-28.

Braga, L.G.T., Lima, S.L. (2001). *Influence of Environmental Temperature on the Bullfrog Performance, Rana catesbeiana (Shaw, 1802) in the Growing Phase*. R. Bras. Zootec. **30** (6).

Brühl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., Alscher, A., (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? Scientific Reports (3):1135.

Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Ale, E., (2006). *Induction of micronuclei in tadpoles of Odontophrynus americanus (Amphibia:*

*Leptodactylidae*) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **88**, N. 4, P. 729-737.

Cardoso, CAL., Coelho RG, Honda NK, Pott A, Pavan FR & leite CQF., (2013). *Phenolic compounds and antioxidant, antimicrobial and antimycobacterial activities of Serjania erecta Radlk. (Sapindaceae)*. *Braz J Pharm Sci* **49**: 775-782.

Colli, G.R., Vieira, C.R., Dianese, J.C., (2020). *Biodiversity and conservation of the Cerrado: recente advances and old challenges*. *Biodiversity and Conservation* **29**:1465–1475.

Coutinho, L. M. O., (2006). *Conceito De Bioma*. *Acta Botanica Brasílica*, **20**, N. 1, P. 13-23.

Correia Filho, W.L.F., Oliveira-Júnior, J.F., Santiago, D.B., Abdo, H.G., Almohamad, H., Al Dughairi, A.A., Silva Júnior, C.A., (2023). *The assessment of climatic, environmental, and socioeconomic aspects of the Brazilian Cerrado*. *Ecological Processes* 12:19.

Cruz-Esquivel, A., Vilorio-Rivas J, Marrugo-Negrete J., (2017). *Danos genéticos em Marina de Rhinella populações em habitats afetados pela agricultura na região média do rio Sinú, Colômbia*. *Environ Sci Pollut Res* **24**: 27392–27401.

De Freitas, STF., Rodrigues ARDS, Ataídes ACC, de Oliveira Menino GC, de Faria GS, Vitorino LC, Silva FG, Dyszy FH., (2022). *Inhibitory effects of Serjania erecta on the development of Chrysodeixis includens*. *Sci Rep* **12**(1):14702.

De la Riva, I., (1993). *Ecología de una comunidad neotropical de anfibios durante la estación de lluvias*. PhD thesis, Univ. Complutense, Madrid. <<http://webs.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/X/3/X3028701.pdf>>, 17/01/2024.

Eterovick, PC., Souza, AM., Sazima, I., (2020). *Gráfion Estúdio Editorial ...*, - *researchgate.net*. *Anuran Amphibians from the Serra do Cipó*. *researchgate.net*. 08/07/2024.

Fenech M. (2000). *The in vitro micronucleus technique*. *MutatRes Genet ToxicolEnviron Mutagen* **455**:81–95.

Fernando, V.A.K., Weerasena, J., Lakraj, G.P., Pereira, I.C., Dangalle, C.D., Handunnetti, S., Premawansa, S., Wijesinghe, M.R., (2016). *Lethal and sub-lethal effects*

on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. *Aquat. Toxicol.* **177**, 98e105.

Freitas, S. T. F., (2018). *Potencial De Extratos De Plantas No Controle De Insetos-Praga: Um Levantamento Cienciométrico E Análises De Efeitos Biológicos De Extratos Foliares De Serjania Erecta Radlk Em Chrysodeixis Includens*.

Fushimi, M., Lima, G.N., Capoane, V., (2024). *Changes in land use and cover and their environmental impacts in the Cerrado of Mato Grosso do Sul, Brazil*. *Sustainability* (16): 4266.

Gosner, K.L., (1960). *A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification*. *Herpetologica*, **16**, 183-190.

Gotelli, N.J., Ellison, A.M., (2011). *Princípios de estatística em Ecologia*. Porto Alegre: Artmed.

Guerra, V., Jardim, L., Lusia, D., Márquez, R., Bastos, R.P., (2020). *Knowledge status and trends in description of amphibian species in Brazil*. *Ecological Indicators* (118):106754.

Hernández G. P., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K. et al., (2012). *In vitro and in vivo trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula*. *Parasitol Res* **110**, 31–35.

Heyer, W.R., (2005). *Variation and taxonomic clarification of the large species of the Leptodactylus pentadactylus species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, Northern South America, and Amazonia*. *Arquivos de Zoologia* **37**(3): 269-348.

IUCN, (2024). *Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN*. Versão 2023-1. <<https://www.iucnredlist.org>>, 17/01/2024.

Kassambara, A., (2023). *ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots*. *R package version 0.6.0*. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.

Kassambara, A., (2023). *rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests*. *R package version 0.7.2*. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>.

Kopp, K., Signorelli, L., Bastos, R.P., (2010). *Distribuição temporal e diversidade de modos reprodutivos de anfíbios anuros no Parque Nacional das Emas e entorno, estado de Goiás, Brasil*. *Iheringia, Série Zoolologia*, **100**: 192-200.

Luedtke, J.A., Chanson, J., Neam, K., Hobin, L. *et al.*, (2023). *Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats*. *Nature*(662):308-314.

Machado, R.B., Aguiar, L.M.S., Bustamante, M.M.C., (2023). *Why is it so easy to undergo devegetation in the Brazilian Cerrado? Perspectives in Ecology and Conservation* 2(3): 209-212.

Mansano, C. F. M., Vanzela, L. S., Américo-Pinheiro, J. H. P., Macente, B. I., Khan, K. U., Fernandes, J. B. K., Frias, D. F. R., De Stéfani, M. V., (2019). *Importance of optimum water quality indices in successful frog culture practices*. In: GÖKÇE, D. (Orgs.) *Limnology - Some New Aspects of Inland Water Ecology*. cap. 7, p.134-154.

Moreira, R.A., Freitas, J.S., da Silva Pinto, T.J., (2019). *Mortality, Spatial Avoidance and Swimming Behavior of Bullfrog Tadpoles (Lithobates catesbeianus) Exposed to the Herbicide Diuron*. *Water Air Soil Pollut* **230**, 125.

Natale, G.S., Vera-Candioti J, de Arcaute CR, Soloneski S, Larramendy ML, Ronco, AE., (2018). *Lethal and sublethal effects of the pirimicarb- based formulation Aficida (R) on Boana pulchella (Dumeril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae)*. *Ecotoxicol Environ Saf* **147**:471–479.

Neves, Mo., Yves A, Pereira EA, Alves L, Vasques JB, Coelho JFT, Silva PS., (2019). *Herpetofauna in a highly endangered area: the Triângulo Mineiro region, in Minas Gerais State, Brazil*. *Herpetozoa* **32**: 113-123.

Obiakor, M. O., Tighe, M., Pereg, L., Maher, M., Taylor, A. M., Wilson, S. C., (2021). *A pilot in vivo evaluation of Sb (III) and Sb (V) genotoxicity using comet assay and micronucleus test on the freshwater fish, silver perch Bidyanus bidyanus (Mitchell, 1838)*. *Environmental Advances*, v. 5, p. 100109.

Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Bassó, A., Grenón, P., Lajmanovich, R. C., (2013). *Cholinesterase activities and behavioral changes in Hypsiboas pulchellus (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide*. *Ecotoxicology*, **22**, n. 7, p. 1165–1173.

Perez Iglesias, J. M., (2015). *Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., Oliveira, C., Natale, G.S., (2016). *Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran Leptodactylus latinasus*. Environmental Science and Pollution Research, **23**: 9852–9861.

Pignati, W.A., Lima, F.A.N.S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.C., (2017). *Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde*. Ciência e Saúde Coletiva, **22**: 3281-3293.

Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L., (2015). *Common toad Rhinella arenarum (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes*. Environmental Monitoring and Assessment, **187**: 581.

Pollo, F.E., Grenat, P.R., Salinas, Z.A., Otero, M.A., Salas, N.E., Martino, A.L., (2017). *Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad Rhinella arenarum in environments related to fluorite mine*. Environmental Science and Pollution Research, **24**: 18179–18187.

R Core Team, (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Segalla, M.V., Berneck, B., Canedo, C., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Garcia, P.C.A., Grant, T., Haddad, C.F.B., Lourenço, A.C.C., Mângia, S., Mott, T., Nascimento, L.B., Toledo, L.F., Werneck, F.P. AND Langone, J.A., (2021). *List OF Brazilian AMPHIBIANS*. Herpetologia Brasileira, **10**, No. 1, Pp. 121-216.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., (1988). *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp. Cell Res., **175**, n. 1, P. 184-91, 198.

Teodoro, M., Duarte, V. S., Costa, M. R. M., Nehring, R., Silva, S. D., Boggione, G. A., Napolitano, H. N., (2023). *Environmental assessment of pesticide use in the region of Brasil*. Ambiente e Sociedade, **26**.

Udroiu, I., Sgura, A., Vignoli, L., Bologna, MA., D'Amen, M., Salvi, D., Ruzza, A., Antoccia A., Tanzarella, C., (2015). *Micronucleus test on Triturus carnifex as a tool for environmental biomonitoring*. Environ Molec Mutagenesis **56**:412–417.

Vasconcelos, A. M., (2014). *Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de Lithobates catesbeianus (Amphibia, Anura, Ranidae)*. 188 f. Tese (Doutorado em Química) Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo.

Ventura, AS., Corrêa Filho. RAC., Spica, LN., Silva, ACF., Araújo, AM., Cardoso, CAL., Jerônimo, GT., (2021). Povh JA. *Toxicological, biochemical and morphophysiological effects of Serjania erecta leaf aqueous extract on Piaractus mesopotamicus*. An Acad Bras Cienc. Sep 3,**93**(4): e20190479.

World Health Organization (WHO), (2022). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda*. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wrubleswski, J., Reichert, F. W., Galon, L., Hartmann, P. A., Hartmann, M. T., (2018). *Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of Physalaemus cuvieri (Anura, Leptodactylidae)*. Ecotoxicology, **27**, n. 3, p. 360–368.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo demonstrou que o extrato foliar metanólico de *S. erecta* apresenta significativo potencial citotóxico e genotóxico, evidenciado pelos efeitos sobre *L. labyrinthicus*, e também mostrou atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia sp.* e *Fusarium sp.* A atividade mais expressiva foi observada contra *S. sclerotiorum*, enquanto *Rhizoctonia sp.* respondeu moderadamente e *Fusarium sp.* apresentou mínima resposta. A capacidade do extrato de degradar compostos aromáticos e fluoretados ou clorados foi observada na interação com *Rhizoctonia sp.*, e, embora não desejado no contexto deste estudo, pode sugerir um potencial ecológico interessante. Este microrganismo, com a capacidade de metabolizar compostos aromáticos, pode ter aplicação como biorremediador na degradação de xenobióticos presentes no ambiente, similar ao comportamento observado em *Pseudomonas sp.*

Além disso, o teste do micronúcleo é eficaz para avaliar os efeitos de novas substâncias, como o extrato de *S. erecta*, em organismos não alvo, destacando a importância da genotoxicidade na análise de pesticidas botânicos. Embora esses pesticidas naturais, como o extrato de *S. erecta*, apresentem vantagens em termos de degradação ambiental e menor impacto ecológico em comparação aos pesticidas tradicionais, é fundamental considerar os efeitos sobre diferentes organismos, antes da aplicação ampla. O estudo reforça que, mesmo sendo de origem natural, essas substâncias não devem ser consideradas isentas de risco, destacando a necessidade de uma avaliação detalhada dos mecanismos de ação.