

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS *CAMPUS* SOROCABA  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS  
DAS ÁGUAS DO RIO PIRAJIBÚ POR ANÁLISES DE BIOMARCADORES  
BIOQUÍMICOS NO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃS-TOURO.

Orientadora: Cleoni dos Santos Carvalho

Orientado: João Victor Cassiel Ferraz

SOROCABA – SP

2021

JOÃO VICTOR CASSIEL FERRAZ

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS  
DAS ÁGUAS DO RIO PIRAJIBÚ POR ANÁLISES DE BIOMARCADORES  
BIOQUÍMICOS NO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃS-TOURO.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Departamento de Biologia  
da Universidade Federal de São Carlos  
*Campus Sorocaba* - UFSCar como parte  
dos Requisitos para obtenção do Título de  
Bacharel em Biologia, sob Orientação da  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cleoni dos Santos Carvalho.

SOROCABA – SP

2021

**Folha de aprovação**

João Victor Cassiel Ferraz

**“Avaliação ecotoxicológica de metais potencialmente tóxicos das águas do rio Pirajibú por análises de biomarcadores bioquímicos em girinos de rãs-touro”**

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba

Sorocaba, 12 de novembro de 2021.

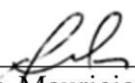
Orientadora

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

Membro 1

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexander Vicente Christianini

Membro 2

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mauricio Cetra

Dedico este trabalho a Alexandra Elbakyan, criadora do Sci-Hub, pela sua luta constante pela universalização do conhecimento como um direito e não uma mercadoria.

## **Agradecimentos**

A minha família, que me apoiou e incentivou na entrada e execução do curso, sobretudo a minha mãe Marta Aparecida da Silva Ferraz, por sua luta constante para a minha permanência na universidade.

As minhas professoras de biologia do ensino médio e curso técnico, Maria Tereza e Ivana, por serem incentivadoras e inspirações para que eu iniciasse meu curso.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, laboratório onde executei minhas análises, onde aprendi muito e cresci como estudante e profissional, aprendi diversas técnicas e habilidades.

A técnica de laboratório Heidi Samantha Moraes Utsunomiya que me auxiliou em diversos momentos no laboratório, ensinando diversas coisas como técnicas, uso de equipamentos e organização dentro do laboratório, sendo minha companhia em diversos momentos e uma amiga.

Ao aluno Gabriel Hiroshi Fujiwara que me auxiliou em algumas técnicas nesse período de pandemia, sendo muito atencioso e prestativo na execução de um trabalho no qual não possuía obrigações.

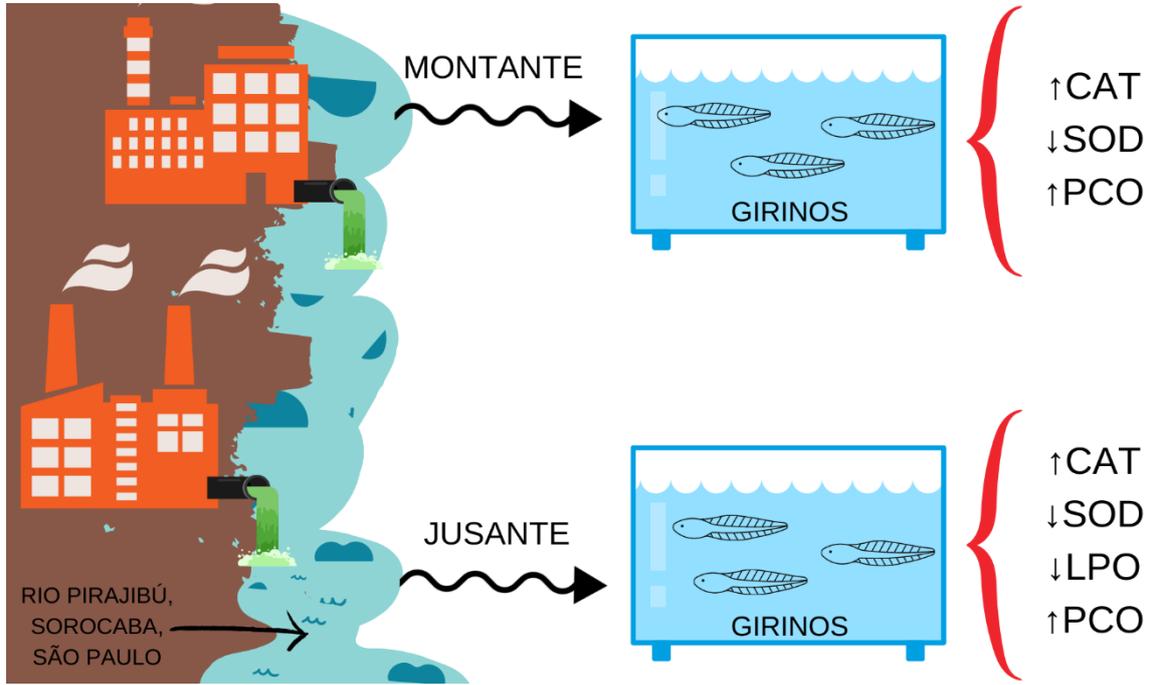
Aos meus amigos de faculdade Isis Minhós Yano, João Victor Mendonça de Oliveira, Isabelle Christine Corrêa de Araújo, João Victor Oliveira Souza, Fernanda Campos dos Santos, Bárbara Silva Barbosa e minha dupla de todas as atividades Raissa Razera, que me proporcionaram os melhores momentos da minha vida me possibilitando sorrir mesmo nos dias mais difíceis, sendo companheiros constantes de estudo e um apoio emocional gigantesco.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por depositar confiança em mim e me conceder uma bolsa (processo 2020/06879-8) que auxiliou em muito a execução do projeto.

A Lei nº 12.711/2012 – conhecida como “Lei de Cotas”, que proporciona a entrada de alunos de baixa renda, assim como eu, compensando em partes a defasagem existente na educação pública brasileira.

A minha orientadora Cleoni dos Santos Carvalho que me auxiliou durante dois anos e meio, sendo extremamente prestativa e atenciosa, além de paciente em suas explicações para um aluno em formação. Sua orientação foi um grande privilégio que recebi em minha graduação.

### RESUMO GRÁFICO



## RESUMO

A contaminação ambiental do meio aquático por metais é uma grande preocupação e recebeu considerável atenção nas últimas décadas. Os metais, derivados de operações agrícolas e efluentes industriais, podem chegar a diferentes corpos d'água e produzir efeitos tóxicos em organismos aquáticos e, acumulados na biota aquática, podem representar um problema de saúde de interesse público. O presente estudo investigou a presença de metais [Alumínio – Al, Bário – Ba, Cádmio – Cd, Cobalto - Co, Cobre - Cu, Cromo - Cr, Potássio - K, Manganês - Mn, Molibdênio – Mo, Níquel – Ni, Estrôncio – Sr e Zinco – Zn] na água do rio Pirajibú, Sorocaba, SP e verificou o efeito destes metais no fígado de girinos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). Para tanto, a água foi coletada em dois locais do rio (Montante e Jusante da Zona Industrial), no período seco do ano, e os girinos foram expostos a estas águas durante 96h, como grupo controle foi utilizada a água de torneira declorada da UFSCar campus Sorocaba. Para a avaliação dos efeitos em rãs-touro foram analisadas as seguintes variáveis no fígado: atividade das enzimas antioxidantes: SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase), níveis de LPO (peroxidação lipídica), PCO (proteínas carboniladas) e da MT (metalotioneína). Os dados da água foram comparados com os limites estabelecidos pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 de 2005. Como resultados, em comparação ao grupo controle, a atividade da CAT foi maior em Montante e Jusante e da SOD foi menor, LPO foi menor na Jusante, PCO foi maior na Montante e Jusante e não houve alterações significativas nas concentrações de MT. Os resultados mostram que embora os metais estejam abaixo do limite da resolução CONAMA a exposição aguda a água do rio Pirajibú causou estresse oxidativo nos girinos.

Palavras-chave: Metais, rã-touro, Pirajibú, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Environmental contamination of the aquatic environment by metals is a major concern and has received considerable attention in recent decades. Metals, derived from agricultural operations and industrial effluents, can reach different water bodies and produce toxic effects on aquatic organisms and, accumulated in the aquatic biota can represent a health problem of public interest. The present study investigated the presence of metals [Aluminum - Al, Barium - Ba, Cadmium - Cd, Cobalt - Co, Copper - Cu, Chromium - Cr, Potassium - K, Manganese - Mn, Molybdenum - Mo, Nickel - Ni, Strontium - Sr and Zinc - Zn] in the water of the Pirajibú River, Sorocaba, SP and verified the effect of these metals on the liver of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). For this purpose, water was collected from two sites of the river (Montante and Jusante of the industrial area), during the dry period of the year, and the tadpoles were exposed to these waters for 96h. As a control group, tap water from the UFSCar campus Sorocaba was used. For the evaluation of the effects on bullfrogs, the following variables were analyzed in the liver: activity of the antioxidant enzymes: SOD (superoxide dismutase) and CAT (catalase), levels of LPO (lipid peroxidation), PCO (carbonylated proteins) and of MT (metallothionein). The data of the water were compared with the limits established by the resolution of the National Council of Environment (CONAMA) no. 357 of 2005. As results, in comparison with the control group, the CAT activity was higher in Montante and Jusante and the SOD was lower, LPO was lower in Jusante, PCO was higher in Montante and Jusante and there were no significant changes in the concentrations of MT. The results show that although the metals were below the CONAMA resolution limit the acute exposure to Pirajibú River water caused oxidative stress in tadpoles.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GRÁFICO</b> .....	5
<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1. Fundamentação Teórica .....	12
1.1.1. Metais potencialmente tóxicos .....	12
1.1.2. Biomarcador .....	13
1.1.3. Anfíbios .....	14
1.1.4. Rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ) .....	16
1.1.5. Estresse oxidativo .....	19
1.1.6. Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Lipoperoxidação (LPO) e Proteínas Carboniladas (PCO) .....	19
1.1.7. Metalotioneína (MT).....	24
1.1.8. Rio Pirajibú .....	25
<b>2. OBJETIVO</b> .....	28
2.1. Objetivos específicos.....	28
<b>3. MÉTODO</b> .....	29
3.1. Procedimentos experimentais.....	29
3.1.1. Obtenção dos animais .....	29
3.1.2. Coleta de água e exposição dos animais.....	30
3.1.3. Análises da água .....	33
3.1.4. Obtenção do homogenado .....	34
3.1.5. Análises bioquímicas .....	35
3.1.6. Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR).....	36
3.1.7. Análise estatística.....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A sociedade sempre teve o seu desenvolvimento ligado diretamente a disponibilidade de recursos hídricos, e historicamente é possível constatar que diversos povos e civilizações ancestrais floresceram nas planícies de grandes rios, tais como o Indo, que percorre territórios chineses, indianos e paquistaneses, Tigre e Eufrates na Mesopotâmia, e o rio Nilo no Egito (ISACHENKO, 2011). Segmentos como a agricultura, indústria e o setor doméstico, dependem diretamente dos recursos hídricos para o seu funcionamento. Ademais, a manutenção da homeostase dos ecossistemas, e de suas respectivas funções ambientais também está atrelada a esses recursos (CURMI *et al.*, 2013). Com o avanço constante da industrialização e urbanização extensivas, está ocorrendo um aumento da concentração de contaminantes no ambiente aquático. Diversos trabalhos relatam efeitos adversos nos organismos aquáticos ocasionados por agroquímicos, estrogênios e os metais (BILA e DEZOTTI, 2003, PARK e KIDD, 2005, RUAS *et al.*, 2008, CARVALHO *et al.*, 2012, MEMMERT *et al.*, 2013, SAKURAGUI *et al.*, 2013, CAMPANHA *et al.*, 2015, CARVALHO *et al.*, 2017).

O estresse ocasionado por estes compostos aumenta as espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, e radical hidroxila, levando ao estresse oxidativo em peixes (RADHAKRISHNAN, 2008, RUAS *et al.*, 2008, MONTEIRO *et al.*, 2009, RADHAKRISHNAN e HEMALATHA, 2009, CARVALHO *et al.*, 2012, 2015). Os sistemas de defesa antioxidante, representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), protegem os organismos do estresse oxidativo causado pela presença de compostos xenobióticos no meio como verificado no fígado e rim de peixes (VIARENGO *et al.*, 2007, MONTEIRO *et al.*, 2009, CARVALHO *et al.*, 2012, SAKURAGUI *et al.*, 2013, CARVALHO *et al.*, 2015) e de anfíbios (COSTA *et al.*, 2008, FERRARi *et al.*, 2009, VERONEZ *et al.*, 2016).

Em 1969 o termo “ecotoxicologia” foi cunhado por Truhaut durante uma reunião de um Comitê *ad-hoc* do Conselho Internacional de Uniões Científicas (ICSU), como um ramo da toxicologia que se preocupa com o estudo de efeitos tóxicos,

causados por poluentes naturais ou sintéticos, aos constituintes de ecossistemas, animais (inclusive humanos), vegetais e microbianos, em um contexto integral (TRUHAUT, 1977). Sendo ela uma ciência que envolve diversas escalas, como a molecular, fisiológica e até níveis ecossistêmicos, envolvendo diversas áreas de conhecimento (bioquímica, química analítica, ecologia, toxicologia) (RATTNER, 2009).

Truhaut (1977) salienta ainda que os estudos ecotoxicológicos compreendem três sequências:

- (1) Estudo da emissão e entrada de poluentes no ambiente abiótico, assim como sua distribuição e destino.
- (2) Estudo da entrada e destino dos poluentes no ambiente biótico, como um importante problema de contaminação das cadeias biológicas, em primeiro lugar das cadeias alimentares.
- (3) Estudo, qualitativo e quantitativo, dos efeitos tóxicos dos poluentes químicos, a um certo nível, para os ecossistemas.

Desta forma os testes toxicológicos tornam-se importantes para a compreensão da ação tóxica dos xenobióticos, e a utilização dos biomarcadores em um determinado organismo. Os biomarcadores compreendem as alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de um ou mais contaminantes no ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003) refletindo em uma resposta do organismo que pode ser comportamental, fisiológica, celular, bioquímica ou molecular (WHO, 1993). Respostas biológicas no nível bioquímico e fisiológico geralmente são as mais sensíveis e as primeiras a aparecerem (SAN JUAN *et al.*, 2020).

Os organismos quando expostos a ambientes contaminados expressam respostas biológicas como ativação dos mecanismos envolvidos na desintoxicação e excreção, que podem ser analisados e indicar a detecção do efeito destes xenobióticos nos organismos (BILA e DEZOTTI, 2003, PARK e KIDD, 2005, RUAS *et al.*, 2008, CARVALHO *et al.*, 2012, MEMMERT *et al.*, 2013, SAKURAGUI *et al.*, 2013, CAMPANHA *et al.*, 2015, CARVALHO *et al.*, 2017, HINOJOSA-GARRO *et al.*, 2020).

Os efeitos toxicológicos se manifestam inicialmente no nível molecular ou bioquímico, podendo estes biomarcadores (ou seja, marcadores biológicos) serem utilizados como indicadores sensíveis da exposição tóxica. Uma vez que se tratam de alterações incipientes, os biomarcadores indicam a presença de contaminantes antes mesmo de seus efeitos se manifestarem nos indivíduos, permitindo a antecipação dos efeitos e impactos adversos em níveis biológicos superiores, como em populações, comunidades, e no ecossistema, etc (VAN DER OOST *et al.*, 2003, SANTANA *et al.*, 2018). Sendo assim, os biomarcadores mostram-se uma ótima alternativa, ou uma ferramenta complementar, aos ensaios ecotoxicológicos tradicionais (VAN DER OOST *et al.*, 2003, CARLSSON e TYDÉN, 2018). Um avanço importante para o interesse na toxicidade do oxigênio e dos radicais livres ocorreu quando a existência da SOD e de proteínas que promoviam a dismutação de radicais superóxido foi descrito, levando a criação da teoria do superóxido e da toxicidade do oxigênio (KOHEN e NYSKA, 2002).

Para a realização adequada de análises ecotoxicológicas é necessário conhecer o organismo modelo para facilitar a interpretação dos resultados, e uma das maiores dificuldades em realizar a extrapolação dos dados do laboratório para o campo, é que só é possível estudar uma pequena quantidade de espécies de interesse no laboratório. Assim, selecionar espécies sensíveis ou importantes que podem ser estudadas é um fator difícil. Espécies que possuem uma ampla distribuição em ambientes poluídos e representativas dos principais grupos de animais são as escolhas mais lógicas (WALKER, 1998, CALISI *et al.*, 2013).

Dentre os grupos de vertebrados, os anfíbios estão entre os mais vulneráveis e ameaçados por contaminantes ambientais que podem ter origem de atividades antrópicas, destacando-se os metais potencialmente tóxicos, pesticidas hidrocarbonetos, fertilizantes, fármacos e microplásticos (SIEVERS *et al.*, 2019). Os anfíbios podem ser particularmente vulneráveis à exposição a contaminantes, uma vez que costumam viver e se reproduzir em áreas projetadas para receber águas contaminadas (áreas úmidas de águas pluviais recebendo escoamento urbano, por exemplo) (SIEVERS *et al.*, 2018) e em locais onde produtos químicos são adicionados intencionalmente (como áreas úmidas agrícolas recebendo pesticidas e fertilizantes) (HAZELL *et al.*, 2001). Diversas análises indicam que, embora a riqueza de espécies

e a densidade populacional em áreas urbanas úmidas possam ser comparadas com áreas naturais úmidas, frequentemente a aptidão dos organismos é comprometida (SIEVERS *et al.*, 2017).

A poluição dos ecossistemas aquáticos por metais potencialmente tóxicos é preocupante devido à sua toxicidade e capacidade de bioacumulação (WU *et al.*, 2018), quando acumulados em grandes concentrações causam efeitos nocivos no sangue e órgãos de organismos aquáticos, podendo reagir com enzimas, DNA, RNA e proteínas celulares (AKAHOKI *et al.*, 1999). Existe hoje, um número limitado de trabalhos que estudam os efeitos de misturas de metais em ambientes naturais, principalmente quando estes estão em níveis menores do que aqueles permitidos por legislações, portanto a avaliação da toxicidade de misturas de metais em concentrações baixas, torna-se importante para a vida dos organismos (YOLOGLU e MURAT, 2015). Os seres humanos alteraram e continuam alterando os ambientes naturais a taxas alarmantes, ocasionando impactos significativos na vida de animais silvestres (PEREIRA *et al.*, 2010).

## 1.1. Fundamentação Teórica

### 1.1.1. Metais potencialmente tóxicos

Metais potencialmente tóxicos são há muito tempo reconhecidos como poluentes ambientais, a toxicidade presente nesses elementos é um problema que vem tomando grande significância por seus impactos ecológicos, evolutivos, nutricionais e ambientais. Os metais potencialmente tóxicos incluem chumbo (Pb), cádmio (Cd), níquel (Ni), cobalto (Co), ferro (Fe), zinco (Zn), cromo (Cr), arsênio (As), prata (Ag) e os elementos do grupo da platina (NAGAJYOTI, 2010).

A carga de metais potencialmente tóxicos no ambiente é relacionada a fatores naturais, como erosão e incêndios, assim como com a ação antropogênica, como a indústria e agricultura (KOVACIK *et al.*, 2017). A toxicidade desses metais nos ecossistemas aquáticos muda de acordo com as variáveis ambientais, incluindo

fatores físicos e químicos, como a quantidade de matéria dissolvida, o pH da água e a temperatura (SANTORE *et al.*, 2002). Esses metais podem tornar-se biodisponíveis por ações humanas que os liberam no ambiente, penetrando na biota através das membranas celulares fosfolipídicas, sendo prejudiciais, pois os organismos expostos são incapazes de metabolizá-los (WALKER *et al.* 2001).

Os tecidos dos animais são altamente suscetíveis à intoxicação por contaminantes metálicos. Os metais podem distribuir-se por todo o organismo, e ocasionar mudanças na estrutura e função das proteínas, organelas e células (KOVACIK *et al.*, 2017), afetando vários órgãos, causando assim alterações bioquímicas e fisiológicas nos organismos e prejudicando a homeostase (SARMA *et al.*, 2015, FORMICKI *et al.*, 2008). Por exemplo, embriões e larvas de anfíbios ou outros animais aquáticos, quando expostos a metais potencialmente tóxicos, geralmente tem um aumento na taxa de mortalidade (COMPANY *et al.*, 2004). Alguns órgãos específicos são particularmente afetados e alterados, como o fígado e rins, órgãos esses responsáveis pela eliminação dessas substâncias (GASPARIK *et al.*, 2004). As alterações bioquímicas podem ser diversas, como as alterações nos níveis de enzimas de ação antioxidante, tais como a SOD e CAT, ou o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, os quais estão diretamente ligados ao estresse oxidativo (FERNANDES *et al.*, 2021). Os anfíbios estão mais vulneráveis a contaminação que ocorre nos ambientes aquáticos, constituindo uma fonte de estresse para os organismos aquáticos. Jones-Costa *et al.*, (2018) em um estudo com *Lithobates catesbeianus* exposto ao surfactante alquilbenzeno linear sulfonado (do inglês Linear Alkylbenzene Sulfonate - LAS) verificaram alteração na frequência cardíaca, massa ventricular e respiração, tornando esses animais suscetíveis a predação e menos competitivos em sucesso reprodutivo.

### 1.1.2. Biomarcador

Biomarcador é a definição dada a uma resposta biológica a um produto químico ambiental no nível individual ou abaixo, que demonstra um afastamento do estado normal (PEAKALL E WALKER, 1994). Entretanto, esta mudança não leva em consideração os níveis populacionais, comunidade ou ecossistema, embora sejam a

preocupação final dos ecologistas ao aplicar o conceito de biomarcador (WALKER, 1998).

Os biomarcadores correspondem a alterações biológicas que demonstram efeito tóxico da exposição aos contaminantes presentes no meio ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003, NÜßER *et al.*, 2016), refletida em respostas fisiológicas, comportamentais, celulares, bioquímicas ou moleculares (WHO, 1993), analisadas nos fluidos corpóreos, células, tecidos ou órgãos das espécies avaliadas (LAM e GRAY, 2003), podendo, desta forma, fornecer informações importantes em testes de campo ou laboratoriais, além de serem utilizados para medir uma série de diferentes tipos de respostas, como bioquímicas, celulares e teciduais, considerados importantes ferramentas para monitorar os efeitos biológicos dos poluentes e o estresse ambiental (BELIAEFF e BURGEOT, 2001). Ademais, os biomarcadores podem ser específicos (monitoramento da exposição / efeitos de classes químicas específicas) ou gerais (monitoramento de uma síndrome de estresse genérica, devido ao efeito integrado de várias classes de contaminantes) (CALISI *et al.*, 2013).

### 1.1.3. Anfíbios

Os anfíbios são um dos grupos de animais mais ameaçados do planeta e vem sofrendo um declínio populacional nos últimos anos e hoje pensa-se em 6 hipóteses principais para explicar o fenômeno (COLLINS e STORFER, 2003). As três primeiras, introdução de espécies exóticas, superexploração e mudança no uso da terra já possuem seus efeitos negativos conhecidos. A quarta hipótese baseia-se na mudança global, a quinta refere-se ao uso de pesticidas e outros produtos químicos e a sexta relaciona-se com o surgimento de doenças infecciosas. A sociedade humana atual é a principal responsável por esses fatores (COLLINS e STORFER, 2003).

De acordo com Hayes *et al.* (2010), não há uma causa única para o declínio global das populações de anfíbios, mas sim a interação entre vários fatores e que mesmo que declínios locais possuam causas únicas, é provável que isso ocorra pela interação entre dois ou mais fatores, que juntos são mais prejudiciais do que individualmente. Atualmente cerca de 70% das espécies de anfíbios estão em

declínio. Converse e Grant (2019), salientam que muitas vezes os problemas são identificados por pesquisas científicas, mas nenhuma medida é tomada para revertê-los, criando assim problemas intratáveis pela dificuldade na tomada de decisões. As populações de anfíbios vêm sendo afetadas em uma taxa muito mais rápida do que a taxa de aprimoramento do conhecimento necessário para desenvolver estratégias de conservação adequadas. Assim, faz-se importante compreender e caracterizar os impactos da atividade humana nesses animais para o desenvolvimento dessas estratégias (DA COSTA ARAÚJO e MALAFAIA, 2020; DA COSTA ARAÚJO *et al.*, 2020).

Um grande desafio para a ecotoxicologia e a conservação é que testes de toxicidade de anfíbios normalmente são realizados com a exposição dos animais a apenas um único produto químico. No entanto, na natureza esses animais estão expostos a estressores simultâneos (GREEN *et al.*, 2019). Os anfíbios podem funcionar como indicadores de sensibilidade individual e populacional a estressores antrópicos, tais como poluentes químicos (BÖLL *et al.*, 2013). Em seus estágios iniciais de desenvolvimento, na fase larval, esses animais são mais sensíveis aos poluentes, pois possuem uma taxa de captação mais rápida dos recursos, aumentando a velocidade de processos como a biomagnificação (BRIDGES, 2000), e uma vez que esses animais têm baixa posição trófica e são importantes presas para diversas espécies aquáticas e terrestres, pode haver um alto potencial de transferência trófica de substâncias químicas (ABERCROMBIE *et al.*, 2019).

Com a finalidade de aumentar a eficiência da respiração e os mecanismos de equilíbrio osmóticos, a pele dos anfíbios é particularmente fina e altamente permeável (HEATWOLE e WILKINSON, 2009). Por esse motivo, esses animais são altamente suscetíveis aos xenobióticos devido a falta de uma barreira hidrofóbica e sua alta porosidade às moléculas de água se comparado a outros animais, como porcos, por exemplo (VAN METER *et al.*, 2014).

Estima-se hoje que cerca de 30% das espécies de anuros correm risco de extinção. Aproximadamente 25% das espécies não são conhecidas o suficiente para determinar o grau de ameaça, e desde os anos 1980 vem sofrendo uma crise de grandes proporções (IUCN, 2009). No mundo existem aproximadamente 6100

espécies (FROST, 2007) e destas 849 ocorrem no Brasil (SBH, 2009), sendo o país com a maior diversidade desse grupo de indivíduos (VERDADE *et al.*, 2010). A partir dos anos 2000 os estudos relacionando a poluição ambiental com a diminuição das populações de anuros ganharam força, reforçando este como um dos principais fatores, uma vez que a maioria desses animais depende da água para a realização do seu desenvolvimento larval e que essas substâncias mesmo em pequenas concentrações podem levar a diminuição populacional (SLABY *et al.*, 2019). Além disso, os girinos vivem em águas superficiais, possuem uma pele altamente permeável e passam por diversas alterações morfofisiológicas que são controladas por diversas vias hormonais (SHI, 2000), e uma vez que o metabolismo das larvas de anuros é menor do que o de animais endotérmicos, como aves e mamíferos (MCDIARMID e ALTIG, 1999), as taxas de catabolismo e depuração também são menores, o que ocasiona a bioacumulação de xenobióticos (LILLYWGITE *et al.*, 1999).

Mesmo quando expostos a concentrações ambientalmente seguras de xenobióticos, os girinos podem apresentar alterações em níveis celular, morfológico, bioquímico, fisiológico e individual, prejudicando assim a aptidão dos animais desviando importantes fontes de energia, que podem estar ausentes em outros processos biológicos, como a metamorfose e a rápida resposta de fuga de predadores (JONES-COSTA *et al.*, 2018).

#### 1.1.4. Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

O uso de algumas espécies ou grupos de espécies comuns como sistemas modelos é uma ferramenta de pesquisa utilizada em ecologia e ecotoxicologia e permite o desenvolvimento de projetos de estudo que, de outra forma, seriam impraticáveis ou até mesmo inviáveis. Em particular na toxicologia o uso de uma espécie modelo apresenta facilidades quando se considera a pronta disponibilidade, o baixo custo, o fácil manuseio, o grande número de animais que serão utilizados, as substâncias químicas a serem testadas bem como as análises biológicas propostas. Além disso, existe um compromisso da comunidade científica mundial em seguir os Princípios dos 3Rs, de “redução, substituição (*replacement*) e

refinamento” no uso de animais, aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) a resolução normativa 17, de 3 de julho de 2014, que dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em atividade de pesquisa, a Lei Arouca. O CONCEA é o órgão responsável pelo tratamento digno, humanitário e ético a todos os animais utilizados em atividades de ensino ou pesquisa científica.

*L. catesbeianus* (Figura 1) é nativa da América do Norte e sua introdução no Brasil ocorreu para fins comerciais. Sua introdução na natureza se deu pela fuga dos locais de reprodução e por conta de seu alto nível de adaptabilidade hoje a espécie prospera em grandes áreas. Além disso, possui uma alta homogeneidade genética e por este motivo, quando exposta a xenobióticos, as respostas entre os indivíduos são muito similares (OUELLET *et al.*, 1997). É uma espécie de rã da família Bufonidae que atingiu uma extensa distribuição neotropical, incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Uruguai, e Paraguai, a partir do nível do mar até 2.600 m de altitude. Habita pequenas lagoas ou charcos de água estagnada em habitats secos temperados, principalmente em áreas abertas. Esta espécie se adaptou bem às condições climáticas brasileiras e no Brasil e na Argentina, ocorre principalmente em regiões costeiras. *L. catesbeianus* é de fácil manuseio e aclimata-se às condições de laboratório (CANDIOTI *et al.*, 2010).

Por possuir um longo período de vida larval, essa espécie é especialmente vulnerável a xenobióticos, sendo dessa forma um candidato adequado como espécie modelo para ensaios ecotoxicológicos em anfíbios, se comparado a espécies com estágio larval de duração curta (BOONE *et al.*, 2001, VASCONCELOS *et al.*, 2017). A espécie *L. catesbeianus*, tem sido uma poderosa ferramenta nos estudos sobre os efeitos da poluição, agindo como sentinelas de problemas ambientais (FRANÇA *et al.*, 2015; HAMMOND *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2004). No entanto, ainda existem poucos estudos sobre os efeitos tóxicos de xenobióticos nas atividades enzimáticas em *L. catesbeianus* (COSTA *et al.*, 2008, JONES *et al.*, 2010, VERONEZ *et al.*, 2016, FERNANDES *et al.*, 2021). Alguns estudos sugerem que a contaminação nos ambientes aquáticos e a alteração ou eliminação dos habitats explorados pelos anfíbios pode afetar estes organismos nos níveis de indivíduo,

população e comunidade e podem contribuir também para o seu declínio populacional (BOONE *et al.*, 2007, OSSANA *et al.*, 2010, BRODEUR *et al.*, 2011, ATTADEMO *et al.*, 2014, PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015, SOLONESKI *et al.*, 2016, CARVALHO *et al.*, 2017).

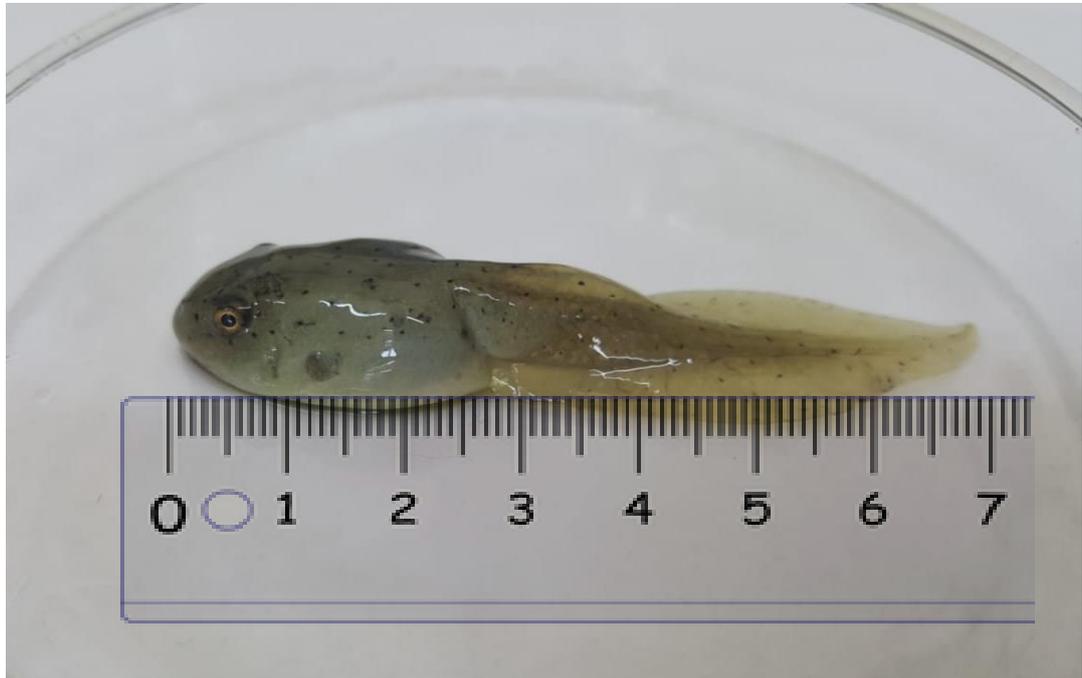


Figura 1: Girinos de Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Autoria: Fernandes, I. F.

*L. catesbeianus* é uma espécie de biologia bem conhecida entre os anfíbios, possui uma grande capacidade adaptativa a diversos ambientes e são de fácil obtenção de exemplares para testes em laboratório. Em contrapartida, existe pouco conhecimento da biologia de espécies tropicais ou subtropicais e restrição quanto a utilização dessas espécies em estudos em toxicologia e, algumas delas estão em risco de extinção. Diversos estudos propõem o uso da *L. catesbeianus* como uma espécie modelo com alto potencial na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas (BOONE *et al.*, 2007, OSSANA *et al.*, 2013, PAETOW *et al.*, 2013, VERONEZ *et al.*, 2016) e os resultados obtidos podem, até certo ponto, ser considerados como subsídio para a criação de normas para a proteção das espécies endêmicas no Brasil. Os girinos se locomovem basicamente pela natação e, desta forma, podem explorar recursos e ambientes que não estão disponíveis para os adultos. Diante do exposto, o girino de rã-touro é um excelente modelo para o estudo

ecotoxicológico em relação ao grupo dos anfíbios que são pouco estudados (HAYES *et al.*, 2010).

#### 1.1.5. Estresse oxidativo

Entende-se o estresse oxidativo como uma disfunção metabólica que favorece a oxidação de biomoléculas, contribuindo para o dano oxidativo das células e tecidos. Ele se dá por um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes causado pela produção excessiva de EROs e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e a não remoção desses pelo sistema de defesa antioxidante (PISOSCHI e POP, 2015). As EROs podem ser representadas por moléculas oxigenadas por radicais livres e não livres, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $1/2 O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), além disso também existem espécies reativas de nitrogênio, ferro, cobre e enxofre (RILEY, 1994). O comprometimento do equilíbrio redox e o estresse oxidativo podem ser atribuídos a essas espécies de radicais, que são gerados em processos aeróbicos, como a respiração celular, exposição a infecções ou ação de poluentes e toxinas (PISOSCHI e POP, 2015). Diversos componentes da estrutura celular, devido à reatividade das EROs, são alvos de danos oxidativos como as macromoléculas (DNA e proteínas) e as membranas celulares (LIEBLER e REED, 1997, AHMAD *et al.*, 2000, VAN DER OOST *et al.*, 2003, VASCONCELOS *et al.*, 2007, CARVALHO *et al.*, 2012, SAKURAGUI *et al.*, 2013, CARVALHO *et al.*, 2015, VERONEZ *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo pode ser dividido em duas formas, a primeira é o chamado estresse fisiológico, ou de níveis baixos, onde o estresse oxidativo acontece em quantidades pequenas o suficiente para que haja uma sinalização do dano nas biomoléculas; e o estresse supra-fisiológico, ou de níveis altos, onde a sobrecarga do estresse leva a uma interrupção da sinalização redox (SIES, 2018).

#### 1.1.6. Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Lipoperoxidação (LPO) e Proteínas Carboniladas (PCO)

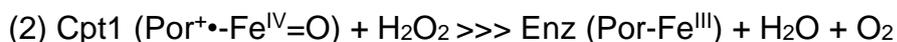
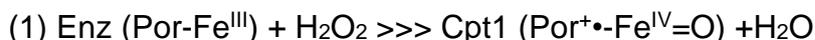
Os radicais livres têm uma meia-vida muito curta, o que os torna difíceis de medir em laboratório, a identificação desses pode ser de maneira direta ou indireta. Os métodos diretos medem o íon superóxido e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por exemplo, e estas espécies são muito reativas e de difícil quantificação, já os métodos indiretos fazem a medição de sistemas endógenos de defesa antioxidante enzimática e não enzimática (POLJSK *et al.* 2013).

A homeostase redox das células é mantida por um completo sistema de defesa antioxidante endógena que inclui enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT (POLJSK *et al.* 2013). Essas enzimas representam a primeira linha de defesa do sistema antioxidante (PISOSCHI e POP, 2015). Além disso, essas duas enzimas em particular apresentam um grande nível de atividade nos primeiros estágios de desenvolvimento dos anfíbios (FERRARI *et al.*, 2009). A CAT é uma das enzimas mais importantes para os sistemas de defesas biológicos, atuando na proteção das células contra as EROs decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (NICHOLLS *et al.*, 2000; SHAHRAKI *et al.*, 2020). É encontrada na maioria das células, tecidos e órgãos e em altas concentrações no fígado e eritrócitos (SUNG *et al.*, 2013).

Ela consiste em um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos porfirina heme (ferro), enterrados no fundo das cadeias, sendo o centro ativo para o peróxido de hidrogênio as porfirinas que são altamente sensíveis a oxiradicaís. Quando o peróxido de hidrogênio se acumula na célula devido a inativação da CAT, as EROs levam a morte celular (MAJUMDER *et al.* 2017; SHAHRAKI *et al.*, 2020, SOTOMAYOR *et al.*, 2015). Em grande parte dos organismos, a CAT é um biomarcador do estresse oxidativo importante e alterações em sua atividade indicam um desequilíbrio do estado redox e, uma vez que a inativação da CAT ocorra a capacidade antioxidante do organismo enfraquecerá (XU *et al.* 2018).

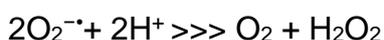
De acordo com Nicholls *et al.* (2000), a reação clássica da CAT parece ser muito simples,  $2\text{H}_2\text{O}_2 \ggg 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , mas existem dois outros estágios no caminho dessa reação. No primeiro estágio o ferro heme é oxidado utilizando peróxido de hidrogênio para formar o composto 1, um tipo de oxiférril com um equivalente de oxidação localizado no ferro e um segundo equivalente de oxidação localizado no

radical de heme cátion (REAÇÃO 1). O segundo estágio, pré-redução do composto 1, emprega uma segunda molécula de peróxido como doador de elétrons, fornecendo dois equivalentes de oxidação (REAÇÃO 2).



Os efeitos deletérios do  $\text{H}_2\text{O}_2$  podem ser indiretos, uma vez que ele é capaz de produzir radicais altamente reativos como resultado de sua interação com íons metálicos (GUTTERIDGE, 1994). A ação direta do  $\text{H}_2\text{O}_2$  envolve o ataque das proteínas que possuem ferro, fazendo com que ocorra a liberação do mesmo, inativação de enzimas e oxidação de moléculas de DNA, lipídeos, grupos -SH (sulfidrilas) e cetoácidos (KOHEN e NYSKA, 2002). Diversos animais expostos a contaminantes orgânicos e metálicos apresentaram respostas da atividade da CAT em experimentos de campo e em laboratório, e a CAT mostrou ser induzida ou inibida por metais dependendo da dose, da espécie ou da via de exposição (ROMEO *et al.*, 2000, SANCHEZ *et al.*, 2005, MONTEIRO *et al.* 2009, CARVALHO *et al.*, 2012, 2015).

A SOD é uma enzima da família de metaloenzimas que tem função antioxidante central, estando presente em todos os organismos aeróbicos observados, tendo assim uma grande importância (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005, 2007). Uma das espécies reativas de oxigênio mais abundantes é o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\text{-}}$ ) que é gerado pelo oxigênio ( $\text{O}_2$ ) após a redução de um elétron. Na reação de redução do  $\text{O}_2$  por dois e três elétrons, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) são produzidos, respectivamente. E, finalmente, a  $\text{H}_2\text{O}$  é produzida após a redução total de  $\text{O}_2$  por quatro elétrons (SIMIC *et al.*, 1991). A SOD catalisa a dismutação do ânion reativo superóxido ( $\text{O}_2^{\text{-}}$ ) em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CIKCIKOGLU YILDIRIM *et al.*, 2020). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  apesar de ser oxidante, não é um radical (PRYOR *et al.*, 2006). O radical superóxido resulta da redução de um elétron do oxigênio molecular por várias oxidases, como a xantina oxidase (XOD) ou a ciclooxigenase (COX) e mostra-se um forte agente redutor contra alguns complexos de ferro como o citocromo C e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GUTTERIDGE, 1994, PISOSCHI e POP, 2015).



Nos tecidos dos mamíferos são encontrados três tipos de SOD: a SOD contendo cobre e zinco (SOD1) encontrada no citosol, possui massa molecular de aproximadamente 32.000 Da, contém 2 subunidades, cada uma das quais possui um sítio ativo; a SOD contendo manganês (SOD2), possui massa molecular de cerca de 40.000 Da, presente na matriz mitocondrial e a SOD extracelular (SOD3). Todas as três são encontradas em grande quantidade nos túbulos renais de rins saudáveis (KOHEN e NYSKA, 2002, SUNG *et al.*, 2013).

Frequentemente é considerado o sistema CAT-SOD, uma vez que a CAT pode catabolizar o produto  $H_2O_2$  da SOD. Dessa forma, a SOD pode alterar a atividade da CAT influenciando na defesa antioxidante (STOREY e STOREY, 2019). Estas enzimas atuam na conversão de radicais reativos em moléculas não reativas, neutralizando as EROs e mantendo o estado redox nos tecidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005, 2007). Portanto, alterações em seus níveis e atividades podem ser utilizadas como biomarcadores em vários organismos aquáticos para monitorar a poluição ambiental. A deficiência dessas enzimas do sistema antioxidante, assim como um grande aumento de EROs, pode levar ao estresse oxidativo, que pode ser caracterizado pela LPO (BOIARSKI, 2020). O sistema SOD-CAT fornece a primeira linha de defesa contra a toxicidade do  $O_2$  e geralmente é usado como um biomarcador indicando a produção de EROs (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Alterações na atividade dessas enzimas estão relacionadas a uma resposta ao aumento da geração de EROs na toxicidade aos xenobióticos em anfíbios (COSTA *et al.*, 2008, FERRARI *et al.*, 2009, VERONEZ *et al.*, 2016, CARVALHO *et al.*, 2020). Estes resultados sugerem que estas enzimas podem ser bons biomarcadores de exposição ao estresse oxidativo causado pelos metais.

Dentre os principais mecanismos de lesão oxidativa, destacam-se a lipoperoxidação (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO), que são frutos da oxidação de lipídeos e proteínas, respectivamente, e que conduzem a perda de estrutura e função dessas macromoléculas. A LPO é uma reação em cadeia que leva a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e à destruição celular ocasionando o estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2003). As EROs podem reagir com ligações duplas dos PUFAs para produzir hidroperóxidos lipídicos. O malondialdeído (MDA), por exemplo, é o produto de oxidação secundária dos PUFAs

peroxidados e demonstrou ter efeitos mutagênicos e citotóxicos e possivelmente estar envolvido na patogênese de várias doenças humanas, incluindo aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (SUNG *et al.*, 2013).

Essa reatividade ocorre devido ao elétron livre (não emparelhado) e a estrutura molecular instável. O elétron livre reage muito rapidamente com quase tudo ao seu redor e, dessa forma, tem a possibilidade de causar danos oxidativos às estruturas e moléculas bioquímicas, como lipídios, proteínas e DNA (LIEBLER e REED, 1997, AHMAD *et al.*, 2000, VAN DER OOST *et al.*, 2003, VASCONCELOS *et al.*, 2007). E, em especial nos lipídios, pode levar a sua peroxidação ou lipoperoxidação (LPO). A LPO representa uma reação em cadeia que ocasiona a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e a destruição celular ocasionando assim o estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2003), sendo sua avaliação um importante biomarcador de estresse oxidativo.

Em condições estressantes, além desses efeitos nos lipídeos, os radicais podem modificar as proteínas e provocar aumento no conteúdo de proteínas carboniladas (PCO). As proteínas podem sofrer oxidação fornecendo derivados carbonílicos e os grupos carbonila (C=O) podem ser introduzidos em proteínas através da reação com aldeídos derivados da LPO (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Alguns estudos relatam estresse oxidativo e produção de PCO em peixes (PARVEZ e RAISUDDIN, 2005, BAGNYUKOVA *et al.*, 2006, MONTEIRO *et al.*, 2010, PAZOS *et al.*, 2011, CATTANEO *et al.*, 2012) e em relação a anfíbios destaca-se o de Young *et al.* (2013) que estudaram o efeito da temperatura na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no músculo do sapo, *Cyclorana alboguttata*, além de Fernandes *et al.* (2021) que avaliaram os níveis de PCO em girinos de *L. catesbeianus* expostos a água do Rio Sorocaba. Assim, a carbonilação de proteínas, que resulta em oxidação de proteínas, pode estar ligada a níveis aumentados de LPO devido a formação de EROs (DALLE-DONNE *et al.*, 2003, MONTEIRO *et al.*, 2010, CATTANEO *et al.*, 2012), mostrando um resultado integrado do dano oxidativo (STADTMAN *et al.*, 2000) e, indicando que o metabolismo normal da proteína foi interrompido. Neste caso, uma mudança em seus níveis pode ser utilizada como biomarcador em diversos organismos aquáticos para monitorar a poluição ambiental e associar a presença de poluentes no ambiente com sua ação em um organismo.

O conjunto de sistemas de defesa das células não-enzimáticos, tais como as Glutationa reduzida – GSH e a Metalotioneína – MT, possuem a mesma capacidade dos sistemas enzimáticos além de neutralizar, inibir ou reduzir as lesões ocasionadas pelas EROs nas células.

### 1.1.7. Metalotioneína (MT)

Uma vez que todos os metais ocorrem naturalmente na crosta terrestre, a grande maioria dos organismos estão adaptados de alguma forma para lidar com a exposição a esses componentes, como por exemplo a ação secundária de metalotioneínas (MT), que se ligam aos metais, em especial o Cd, Cu e Zn, e mantêm a homeostase do corpo. A função primária dessa proteína aparenta ser a regulação do Zn no metabolismo (COYLE *et al.*, 2002).

As MTs pertencem a uma superfamília de proteínas intracelulares de ligação a metais, presente em quase todos os organismos vivos, com predominância no fígado, rim, intestino e pâncreas de vertebrados, normalmente possuindo baixa massa molecular (<7000 Da), sendo compostas por alguns metais como Zn, Cu e Cd e possuindo duas subunidades. A MT é considerada uma proteína de ações multiformes, pois sua ação pode variar de acordo com o organismo na qual ela está presente, no entanto, sabe-se que em muitos vertebrados ela pode garantir uma vantagem de sobrevivência por atuar em situações de estresse como a exposição a oxirradicais e metais potencialmente tóxicos, e possui uma grande afinidade de ligação com os metais Cu, Cd e Zn (COYLE *et al.*, 2002). Por suas cadeias serem ricas em cisteínas (33%), elas se tornam moléculas com forte ligações a metais, podendo atuar como necrófagos de espécies reativas e consequentemente bons biomarcadores (LOUMBOURDIS *et al.*, 2007).

Alguns autores observaram um aumento na atividade da MT no clímax metamórfico dos girinos, como descrito no trabalho de Krohn *et al.* (2020), que estudaram o acúmulo de metais potencialmente tóxicos em girinos de sapo de madeira (*Lithobates sylvaticus*) em períodos pré e pós-metamórficos. De acordo com a autora esse aumento durante a fase de metamorfose ocorre devido a uma grande

produção do hormônio triiodotironina (T3), que induz a produção de MT. No entanto, ainda existem poucos estudos utilizando essa proteína como um biomarcador em sapos, apesar de correlações entre o aumento de metais, principalmente o Cu, serem observadas em alguns estudos (COOPER e FORTIN, 2010). Além disso, níveis mais baixos de MT em tecidos de peixes sugerem uma redução na síntese de MT associada ao aumento da demanda de resíduos de cisteína para a síntese de glutathiona reduzida (GSH) durante a desintoxicação de contaminantes químicos (ROMEO *et al.*, 1997). Assim, o efeito de metais pode ser verificado avaliando-se os níveis de MT nos tecidos de rãs-touro.

#### 1.1.8. Rio Pirajibú

De acordo com a lei nº 16337, de 14 de dezembro de 2016, que dispõe sobre o plano estadual de recursos hídricos, o rio Pirajibú faz parte Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos número 10, UGRHI 10 – Tietê/ Sorocaba (SÃO PAULO, 2016). Sua nascente encontra-se perto da divisa entre Sorocaba e Alumínio, a uma altitude próxima aos 1.000 metros. Possui aproximadamente 43 km de extensão, e sua foz dá no rio Sorocaba, a aproximadamente 540 metros de altitude (MANFREDINI, 2015). Antes de atingir o rio Sorocaba, em seu trecho de maior concentração urbana, o Rio Pirajibú percorre toda a zona industrial da cidade. Possui uma área de drenagem de aproximadamente 414 km<sup>2</sup> (CBH-SMT, 1997). Os afluentes do Rio Pirajibú são: Ribeirão Tapera Grande, Varejão, Mato Dentro e Varjão na margem direita, e o Ribeirão Itaguaraguataú, Rio Pirajibú-Mirim e o Córrego Aparecidinha na margem esquerda (MANFREDINI, 2015), além disso, todos os afluentes da margem esquerda situam-se no município de Sorocaba, enquanto os da margem direita estão por completo nos municípios vizinhos, com exceção do Ribeirão Tapera Grande (WALM, 1999).

## Mapa de afluentes do Rio Pirajibú

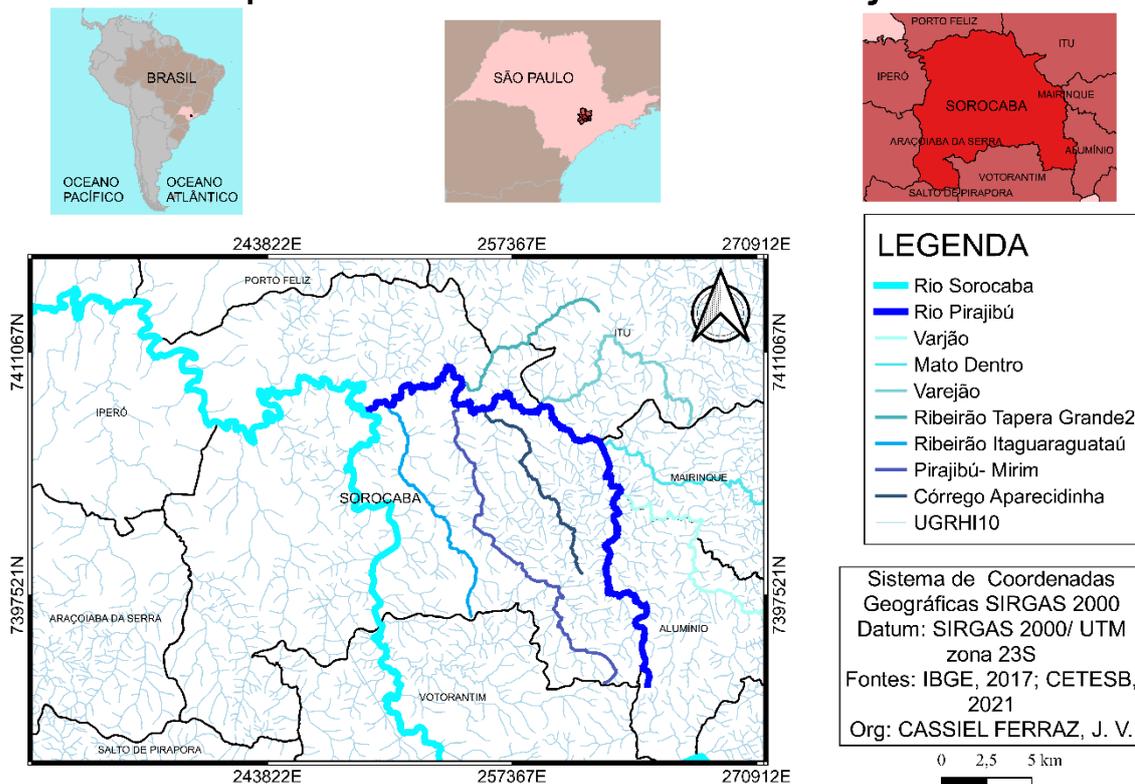


Figura 2: Mapa de localização do Rio Pirajibú na UGRH10.

A bacia hidrográfica do Pirajibú drena parcialmente os municípios de Sorocaba, Itu, Alumínio e Mairinque (Figura 2). Possuindo uma área de drenagem de aproximadamente 41.400 ha, e os cursos d'água da bacia possuem cerca de 540 km de comprimento (MANFREDINI, 2015) e a vegetação presente na extensão da bacia possui caráter ecótono, com características de cerrado e mata atlântica (GARCIA, 2006; CORRÊA, TONELLO e FRANCO, 2016), composta majoritariamente por remanescentes de vegetação secundária, amplamente degradada, composta principalmente por matas ciliares, observadas sobretudo nas nascentes (BARBIERATO, 2014, CANABARRO, TOLEDO e BARRELLA, 2008). Além das áreas de mata, o uso e ocupação do solo na bacia ocorre por áreas de pastagem, agricultura, residências e zona urbana em geral (BARBIERATO, 2014)

Próximo a foz do rio Pirajibú, nas adjacências do bairro Vitória Régia em Sorocaba, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) o monitora, ocorrendo o procedimento desde 2005, e ainda hoje algumas variáveis são

monitorados (CETESB, 2019). A CETESB no sistema infoáguas disponibiliza os dados do monitoramento nas formas dos índices IQA (índice de qualidade das águas), IAP (Índice de Qualidade de Águas Brutas para Fins de Abastecimento Público) e IVA (Índice de Preservação da Vida Aquática).

Destes índices, o IQA é utilizado para fins de abastecimento público e foi o único regularmente monitorado, apresentando um histórico de resultados predominantemente regulares, com alguns índices classificados como bons e outros ruins. As variáveis IAP e IVA, foram monitorados apenas no ano de 2005, sendo classificados como ruins (CETESB, 2019), apresentando assim um risco potencial aos organismos aquáticos e as pessoas que eventualmente possam consumir ou entrem em contato com estas águas.

Na literatura existem poucos registros de contaminantes neste rio. Entretanto, estudos relatam presença de metais como: alumínio (Al), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) no rio Sorocaba, que é onde o rio Pirajibú desagua (PEDRAZZI *et al.*, 2014, CONCEIÇÃO *et al.*, 2015) com valores que oscilaram dos valores máximos permitidos para rios de Classe 2 pela Resolução do CONAMA nº 357, de 18 de março de 2005, tanto no período seco quanto no chuvoso. Deste modo, considerando que a contaminação da água vem crescendo consideravelmente, e que pode gerar um impacto negativo nos organismos aquáticos e na comunidade que ali vivem é importante avaliar a presença de metais e os possíveis efeitos nos organismos aquáticos, além disso, o rio Pirajibú é o principal afluente da margem direita do Rio Sorocaba e possui importância associada ao fato de 10% do abastecimento de água da população de Sorocaba vem de sua bacia hidrográfica (GARCIA, 2006; CORRÊA, TONELLO e FRANCO, 2016).

Somado a isso, segundo o relatório de Recursos Hídricos cadastrados e outorgados pelo DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica), órgão esse responsável pela gestão dos recursos hídricos no Estado de São Paulo, há o descarte de efluentes de algumas empresas no rio Pirajibú, como a Iharabras SA Indústrias Químicas, que fabrica defensivos agrícolas, a Metso Brasil Indústria e Comércio Ltda, com fundição de ferro e aço, Pepsico do Brasil, uma empresa de produtos alimentícios, Textil Dalutex, como o próprio nome sugere a fabricação de produtos

têxteis, ZF do Brasil Ltda, fabricando peças e acessórios para veículos automotores e, entre outras, a empresa Flextronics International Tecnologia Ltda que fabrica alguns equipamentos de informática.

Assim, este conjunto de fatores nos leva as seguintes hipóteses: (1) o rio Pirajibú contém os metais: [Alumínio – Al, Bário – Ba, Cádmiu – Cd, Cobalto - Co, Cobre - Cu, Cromo - Cr, Potássio - K, Manganês - Mn, Molibdênio – Mo, Níquel – Ni, Estrôncio – Sr e Zinco – Zn] e estes metais estão presentes em concentrações acima da permitida pela resolução 357 de 2005 do CONAMA para águas de Classe 2; (2) a concentração destes metais varia nos dois pontos do rio Pirajibú; (3) a presença destes metais altera a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, SOD e catalase, CAT), causa lipoperoxidação (LPO), forma proteínas carboniladas (PCO) e induz a produção de metalotioneína (MT) no fígado de girinos de rãs-touro e (4) os biomarcadores (SOD, CAT, LPO, PCO e MT) variam de acordo com a presença de metais no rio Pirajibú.

## **2. OBJETIVO**

Este estudo pretende verificar como a exposição à água do rio Pirajibú afeta os girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*. O principal objetivo foi avaliar os efeitos da exposição aguda (96h) a água do rio Pirajibú, no fígado de girinos de rã-touro por biomarcadores bioquímicos em dois pontos do rio no período seco (setembro).

### **2.1. Objetivos específicos**

- Verificar a presença e determinar a concentração dos metais na água do rio Pirajibú em dois pontos (Montante e Jusante da Zona Industrial) no período seco;
- Comparar a presença destes metais nos dois pontos;

- Avaliar o efeito destes metais nos girinos expostos a água do rio Pirajibú nos pontos Montante e Jusante da Zona Industrial.
- Determinar a atividade das enzimas SOD e CAT e os níveis de LPO, PCO e MT no fígado de girinos de rãs-touro expostos a água do rio Pirajibú;
- Verificar se esses biomarcadores bioquímicos podem ser utilizados como indicadores biológicos de contaminação aquática;
- Comparar os diferentes biomarcadores e definir quais são relevantes para cada tipo de contaminação.
- Comparar as concentrações e os tipos de metais presentes no rio Pirajibú com dados da literatura.

### 3. MÉTODO

#### 3.1. Procedimentos experimentais

##### 3.1.1. Obtenção dos animais

Os girinos de *Lithobates catesbeianus* foram fornecidos pelo ranário Fazenda Santa Rosa, localizado no município de Santa Bárbara d'Oeste-SP (22°46'53,0"S/47°24'17,7"W) acondicionados em sacos plásticos de capacidade de 80 litros e imediatamente transportados para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) da Universidade Federal de São Carlos-Sorocaba. A obtenção dos animais ocorreu 10 dias antes da exposição para que fosse realizada a aclimação dos mesmos no laboratório.

No laboratório os animais foram mantidos em um aquário de 50 litros com circulação contínua de água declorada, aeração constante, temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), pH 7,2-7,6, oxigênio dissolvido 7,0-7,5 mg/L, dureza 50-58 mg / L (como  $\text{CaCO}_3$ ), condutividade  $56-97 \pm 0,02 \mu\text{S/cm}$  e as concentrações de amônia permaneceram em  $<1 \text{ mg/L}$ . O fotoperíodo foi natural (12h claro: 12h escuro) e os girinos foram mantidos nesta condição até atingirem o estágio 25 de Gosner (1960),

cerca de 10 dias. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial farelada para trutas, que contém de 35 a 40% de proteína bruta uma vez ao dia.

Quando o pH e a temperatura possuem flutuações altas, os anfíbios têm a necessidade de iniciar processos para manter a sua homeostase, fazendo assim com que o metabolismo acelere, conseqüentemente a respiração aumenta e a produção de EROs é maior, levando a um possível estresse oxidativo (MADEIRA *et al.*, 2013; MCDONALD e WOOD, 1980), salientando assim a importância do controle dentro do laboratório.

O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da UFSCar e aprovado sob o nº. 2775051219/2019.

### 3.1.2. Coleta de água e exposição dos animais

A coleta de água do Rio Pirajibú ocorreu em dois pontos (Tabela 1 e Figura 3), Montante que representa a montante e a porção do rio antes da Zona Industrial (Figura 4), e Jusante que representa a jusante após a zona industrial (Figura 5), e ocorreu no dia 07/09/2020, sendo esta realizada manualmente utilizando-se baldes e cordas que eram lançados no rio. Os valores de pH e temperatura foram analisados no momento da coleta de água (Tabela 2). A zona industrial desse trabalho foi delimitada de acordo com o que está disponível no plano diretor da cidade de Sorocaba, regulamentado pela lei nº 11.022, de 16 de dezembro de 2014, e neste, a área delimitada no trabalho é chamada de “Zona industrial I”.

<b>PONTO</b>	<b>LONGITUDE</b>	<b>LATITUDE</b>
Montante	47° 18' 35"W	23° 30' 55"S
Jusante	47° 26' 19"W	23° 24' 57"S

Tabela 1: Localização dos pontos de coleta em coordenadas geográficas. Datum SIRGAS 2000, fuso 23S.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>MONTANTE</b>	<b>JUSANTE</b>
pH	7,0	7,5
Temperatura	20,2°C	22,0°C

Tabela 2: Valores de pH e temperatura da água no momento da coleta.

## Mapa de localização dos pontos de coleta

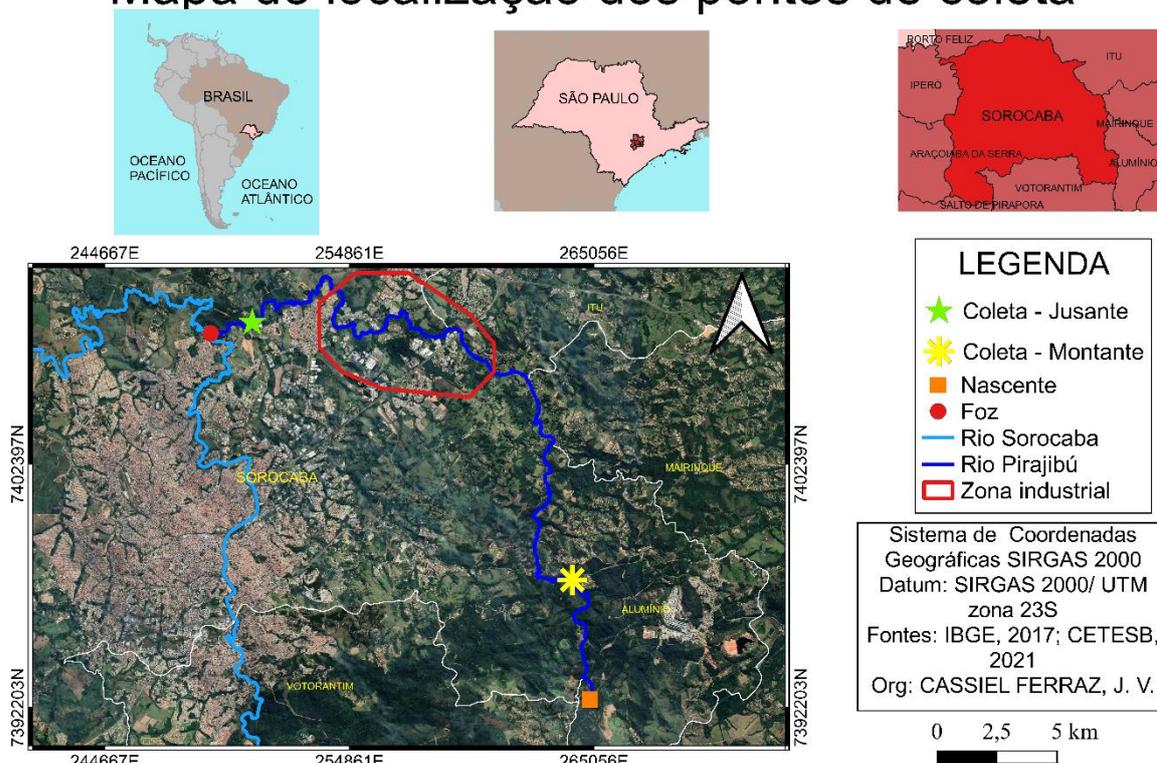


Figura 3: Pontos de coleta de água no Rio Pirajibú

Neste mesmo dia os animais foram expostos a água e permaneceram nela por 96h. Os animais foram separados aleatoriamente em 6 aquários de 16 L contendo 15 animais cada. Antes da transferência dos animais a água do aquário (aquário de teste) eles foram mantidos em sacos plásticos dentro do aquário de teste para aclimação ao novo ambiente. Esse procedimento durou cerca de 3h. Os aquários foram distribuídos em três grupos, grupo controle, contendo água de clorada, grupo Montante com a água da Montante e grupo Jusante que continha água da Jusante. Os testes foram feitos em duplicata. Durante o período de exposição as variáveis da água foram os mesmos da aclimação, aeração constante, temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo natural (12h claro: 12h escuro).

O comportamento dos animais foi monitorado regularmente durante a exposição e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela American Society for Testing and Materials - ASTM (2000).

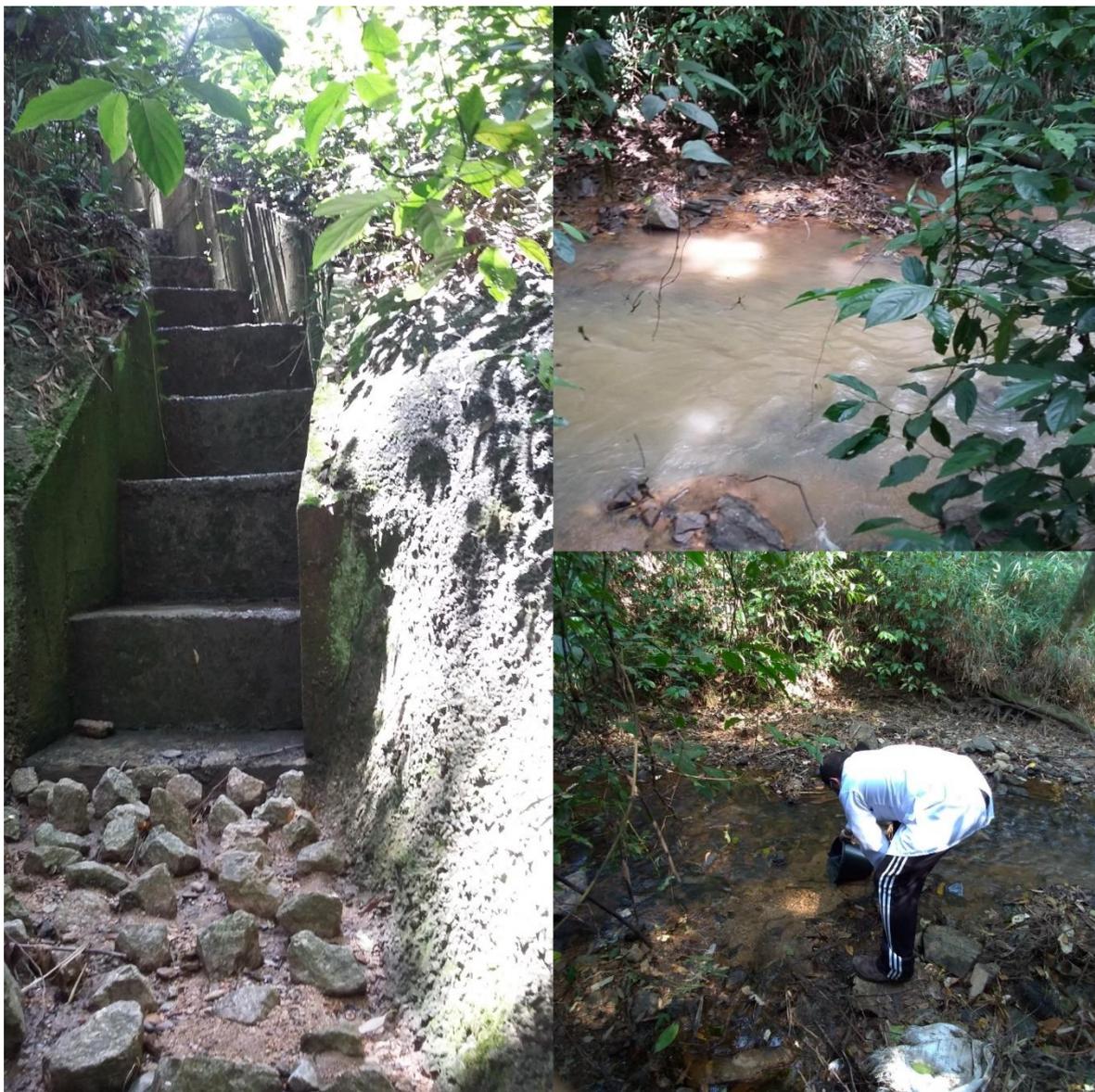


Figura 4: área de coleta do ponto a Montante do rio Pirajibú. Autoria: da Silva, F. H.

Após 96 h de exposição dos animais, no dia 11/09/2020 esses foram anestesiados com benzocaina 0,01% e mortos por secção medular de acordo com a recomendação da American Veterinary Medical Association (AVMA, 2001) e seus órgãos, fígado, rins, músculo, intestino e cérebro, foram coletados e imediatamente congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para as análises bioquímicas. O presente estudo foi realizado no fígado desses animais.

As análises bioquímicas foram padronizadas de acordo com as molaridades dos reagentes presentes no laboratório.



Figura 5: área de coleta do ponto á Jusante do rio Pirajibú. Autoria: da Silva, F. H.

### 3.1.3. Análises da água

Antes e após o período de exposição, amostras de água foram coletadas e divididas em alíquotas diferentes e acondicionadas em recipientes de plásticos e mantidos sob refrigeração. As análises físico-químicas e de metais das amostras foram feitas em triplicata.

As determinações das variáveis físico-químicas nas amostras de água foram realizadas utilizando-se curvas padrão construídas a partir de variáveis experimentais definidas no laboratório. As análises de Dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), Nitrato ( $\text{NO}_3$ ), Amônio ( $\text{NH}_4$ ), Fosfato ( $\text{PO}_4$ ), Fósforo total dissolvido (PDT) e Demanda química de oxigênio (DQO), seguiram os métodos determinados por APHA (2005) descritos em de Moura *et al.* (2016) (Tabela 3).

A maioria das substâncias oxidáveis, orgânicas ou não, presentes nas águas residuais, pode ser quantificada de forma rápida a partir da reação com dicromato, em um meio ácido e quente. Para a DQO, o ácido ftálico de potássio é usado como um padrão (DE MOURA *et al.*, 2016).

O método utilizado para análise dos metais seguiu o procedimento descrito em USEPA (2007), utilizando-se 500 mL da água do rio Pirajibú foram transferidos para um béquer de mesmo volume, e acidificado com ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) até que se alcançasse o  $\text{pH} < 2$ . Neste processo de acidificação foi utilizado o  $\text{HNO}_3$  65% diluído 1:3, (v/v). Efetuada a acidificação, as amostras foram mantidas resfriadas a  $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  até as determinações.

Os metais foram determinados por espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), Modelo MP-AES-4200. A análise dos metais foi realizada pela professora Dra. Luciana Camargo de Oliveira (UFSCar, Sorocaba) e a Dra. Gabriele Verônica de Mello Gabriel bolsista PNPB vinculada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA). Os metais que tiveram suas concentrações analisadas foram o alumínio (Al), bário (Ba), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), estrôncio (Sr), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), potássio (K) e zinco (Zn) (Tabela 4).

#### 3.1.4. Obtenção do homogenado

Após a coleta dos órgãos, todas as amostras foram homogeneizadas individualmente. O fígado foi homogeneizado em 1mL de tampão Fosfato Salina (tampão PBS, contendo 1,36 M de NaCl, 0,027 M de KCl, 0,054 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $7\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,018M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 7,2 em homogeneizador de tecidos do tipo Potter-Elvehjem

Teflon ultraturrax IKA 10®. Todo o processo foi realizado com as amostras de tecido no gelo. Posteriormente o material foi centrifugado a 12.000 g, durante 20 minutos a 4°C, na centrífuga HERMLE Z 323K, para que o sobrenadante pudesse ser fracionado em alíquotas de acordo com as necessidades de cada análise.

### 3.1.5. Análises *bioquímicas*

Para determinação de proteínas totais (BRADFORD, 1976), utilizou-se como padrão proteico albumina sérica bovina em leituras de microplaca a 595 nm, para a criação da curva. As amostras foram lidas utilizando o reativo de Bradford.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de espectroscopia de Aebi (1974) que avalia a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela diminuição da extinção em 240 nm, utilizando peróxido de hidrogênio, tampão Tris-HCl 1,0M, EDTA 5,0 mM (pH 8,0), tampão PBS (pH 7,2) e água ultra pura, e sua atividade calculada como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  decomposto por mg de proteína. A atividade foi expressa como a quantidade de enzima necessária para catalisar a dismutação de 1 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto (U CAT/mg de proteína) (Tabela 5). Foi utilizado um coeficiente de extinção molar de 40 / M.cm.

Enquanto a atividade da SOD foi determinada pelo método de Mccord e Fridovich (1969), utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7.8), solução de EDTA 1mM, solução de KCN 200  $\mu\text{M}$ , solução de citocromo C 100  $\mu\text{M}$  e solução de xantina 500  $\mu\text{M}$ , para o meio de reação e solução de xantina oxidase (5 U/mL). A leitura foi feita no comprimento de onda de 550 nm e os valores da SOD foram expressos em unidades por mg de proteína (Tabela 5), onde uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c.

Já a lipoperoxidação (LPO) foi determinada de acordo com o método descrito por Jiang (1991) que é baseado na oxidação do Fe<sup>2+</sup> por hidroperóxidos lipídicos, na presença do corante laranja de xilenol e lido no comprimento de onda de 560 nm, utilizando-se ácido tricloroacético 10% (TCA) em água ultra pura, metanol 90% (90 mL de metanol PA com 10mL de água), ácido sulfúrico PA (150  $\mu\text{L}$ ),

hidroxitolueno butilado (0,098g), sulfato ferroso amoniacal (0,011 g) e laranja de xilenol (0,0081 g) no preparo do meio de reação. Os resultados foram expressos em: nanomoles de hidroperóxidos por mg de proteína (Tabela 5). Este método é chamado de FOX.

A concentração de PCO foi determinada de acordo com o método descrito por Levine (1994) utilizando água destilada, tampão fosfato salina (PBS) em pH 7,2, 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), solução etanol-acetato de etila 1:1, solução de hidrocloreto de guanidina 6 M, solução de ácido clorídrico (HCl) a 2 M, ácido tricloroacético (TCA) 28% e expressa em nmoles de carbonilas por mg de proteína por ml (Tabela 5), utilizando-se o coeficiente de extinção de 22.000 do DNPH. Este procedimento é realizado em várias etapas até a obtenção das proteínas carboniladas.

Os níveis da MT foram determinados pela concentração de grupamentos SH segundo a metodologia descrita por Viarengo *et al.* (1997) utilizando-se como padrão a GSH. Os reagentes e substâncias utilizadas foram água destilada, tampão fosfato salina (PBS) no pH 7,2, tampão Tris-HCl a 20mM (pH 8,6), tampão fosfato de sódio a 0,2 M (pH 8,0), etanol PA, Metanol PA, HCl 37%, clorofórmio PA, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), glutationa, solução de cloreto de sódio (NaCl) 250 mM, e solução de EDTA-sódico 4mM. Os níveis de MT foram expressos como nmol SH (grupo sulfidril ou tiol) por mg de proteína (Tabela 5), assumindo o valor de 30% de concentração de cisteína. Este procedimento é realizado em várias etapas.

Todas as leituras foram realizadas no espectrofluorímetro Synergy™ HTX (Multi-Mode Reader) ou em cubeta de quartzo para a CAT no espectrofotômetro LIBRA S50, BIOCHROM. Todas as análises foram em triplicatas.

### 3.1.6. Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)

Os valores médios de cada um dos biomarcadores foram utilizados para o cálculo do IBR conforme descrito por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez *et al.* (2013) (IBRv2). A média individual de cada biomarcador ( $X_i$ ) foi dividida pelo respectivo controle ( $X_o$ ), seguido da transformação para log [ $Y_i = \log(X_i/X_o)$ ]. A

média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) de  $Y_i$  foram calculados e normalizados  $Y_i$  [ $Z_i=(Y_i-\mu)/s$ ]. A resposta padronizada do biomarcador ( $Z_i$ ) e resposta padronizada do controle ( $Z_o$ ) são utilizadas para definir o índice de desvio do biomarcador ( $S$ ) [ $S=Z_i-Z_o$ ], utilizado para elaborar o gráfico em radar. A soma do valor absoluto de  $S$  ( $A$ ) representa o valor de IBR. Os resultados são apresentados como gráfico de radar e os valores acima de zero representam a indução dos biomarcadores, enquanto valores abaixo de zero representam inibição dos biomarcadores. O cálculo do IBR foi realizado no programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

### 3.1.7. Análise estatística

Os resultados são apresentados como valores médios  $\pm$  E.P.M. O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras e o teste F foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias (GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software, USA). Para comparações entre os grupos, testes-t (paramétrico) ou teste de U de Mann-Whitney (não paramétrico) foram utilizados. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis físico-químicas da água controle e dos dois pontos, Montante e Jusante da Zona Industrial foram comparados com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/05 para classificação de uso da água do tipo 2 (Tabela 3).

Adicionalmente, foi feita a análise de amostras de água do ranário onde os girinos são mantidos. A água do ranário apresentou valores de DQO = 9,75 mgO<sub>2</sub>/L, NO<sub>2</sub> = 2,1 µg/L, NO<sub>3</sub> = 0,37 mg/L, NH<sub>4</sub> = 86,6 mg/L, PO<sub>4</sub> = 0,37 mg/L e PDT = 1,26 mg/L.

VARIÁVEL	CONAMA ÁGUAS CLASSES I E II (µG/L)	CONTROLE		MONTANTE		JUSANTE	
		Início	Final	Início	Final	Início	Final
DQO (mgO <sub>2</sub> /L)	---	7,25±0,20	56,75±2,12↑	<LQ	42,25±1,02↑	<b>16±2,12#</b>	<b>87,88±2,02#↑</b>
NO <sub>2</sub> (µg/L)	1	2,5±0,04	3,25±0,11↑	ND	<b>1,75±0,22↑</b>	<b>207,2±16,0#</b>	<b>327,75±34,32#↑</b>
NO <sub>3</sub> (mg/L)	10	0,38±0,08	0,30±0,00	<b>0,11±0,01</b>	0,19±0,03	<b>1,38±0,30#</b>	<b>1,43±0,28#</b>
NH <sub>4</sub> (µg/L)	0,02	47,2±2,02	2385,5±168,0↑	<b>29,1±0,81</b>	<b>3069,5±298,02↑</b>	<b>3479,7±281,20#</b>	<b>2933±89,02#↓</b>
PO <sub>4</sub> (mg/L)	0,15	0,08±0,02	0,47±0,03↑	<b>0,03±0,00</b>	<b>0,48±0,09↑</b>	<b>1,0±0,21#</b>	<b>1,02±0,12#</b>
PTD (mg/L)	---	0,33±0,03	1,56±0,09↑	<b>0,19±0,00</b>	<b>1,34±0,22↑</b>	<b>1,89±0,32</b>	<b>2,85±0,20#↑</b>

Tabela 3: Resultados das análises físico-químicas onde estão apresentados Demanda química de oxigênio (DQO), Dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), Nitrato (NO<sub>3</sub>), Amônio (NH<sub>4</sub>), Fosfato (PO<sub>4</sub>) e Fósforo total dissolvido (PDT) analisados nas amostras de água do Rio Pirajibú, Montante e Jusante da Zona Industrial. Em negrito indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo período; # indica diferença significativa em relação aos pontos Mutante e Jusante. <LQ = abaixo do limite de quantificação; ND = não determinado; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição.

As variáveis analisadas estão em conformidade com a resolução CONAMA 357/2005 exceto para  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$  e  $\text{PO}_4$  que estão acima em todas as amostras de água (ranário, controle -  $\text{PO}_4$  final), Montante ( $\text{NO}_2$  e  $\text{PO}_4$  final) e Jusante). As concentrações de DQO,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$  e PDT apresentaram valores mais altos que o controle, tanto a Montante como a Jusante, exceto  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$  (final) na Montante. Destaca-se ainda que no ponto Jusante todas as variáveis analisadas foram mais altas que a Montante, o que está de acordo com o esperado, uma vez que o ponto referente a Montante se encontra próximo a nascente do rio, enquanto a Jusante é localizada após as águas do rio cruzarem a Zona industrial da cidade, que podem estar sujeitas ao descarte de efluentes no rio.

Mesmo sem ter seu valor regulamentado pela Resolução CONAMA 357/2005, a determinação da DQO é um indicador global de matéria orgânica em águas residuais e superficiais, sendo constantemente utilizada em locais onde há a descarga de efluentes líquidos (RADTKE *et al.*, 2019). Esta análise indica a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação da matéria oxidável através de um agente químico (CONSEMA, 2017). Com níveis diminuídos de oxigênio a decomposição da matéria orgânica ocorre em meio anaeróbico enquanto que em meio aeróbico ocorre a decomposição da matéria orgânica carbonácea e nitrogenada que é convertida a nitrato. Tanto o nitrato como o fósforo são nutrientes importantes para os organismos e o fósforo é considerado um fator limitante e em excesso pode levar a um crescimento excessivo de algas e plantas aquáticas ocasionando a eutrofização (MARGALEF, 1974; ODUM, 1988). Como descrito por Sardinha *et al.* (2008) que verificaram um processo de eutrofização no rio Sorocaba associado ao aumento de amônia e fosfato.

Além disso, sabe-se que diversos fatores, como as propriedades físicas e químicas da água, bem como as mudanças sazonais, alteram o efeito dos metais tornando-os potencialmente mais tóxicos e / ou biodisponíveis, principalmente em águas moles e pobres em íons, que apresentam uma baixa capacidade de tamponamento (TAO *et al.*, 2001, YE *et al.*, 2015).

Assim, a avaliação das variáveis físicas e químicas do rio Pirajibú revelou uma condição crescente de interferência antrópica e as alterações nesses fatores

podem influenciar na biodisponibilidade dos metais e, portanto, na sua toxicidade. As formas de nitrogênio disponíveis na água (por exemplo, nitrato ou nitrito), têm consequências para o meio ambiente e os seres vivos desde a ocorrência de doenças ou toxicidade da amônia livre, como a redução do oxigênio dissolvido. O aumento da amônia e do fosfato é de origem antrópica (SARDINHA *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2011, 2015), portanto, a diferença desses fatores entre os dois pontos pode ser decorrente do lançamento de efluentes domésticos e industriais, detergentes, excrementos de animais e uso de fertilizantes.

Os resultados para as análises dos metais da água do grupo controle e dos dois pontos, Montante e Jusante da Zona Industrial, foram comparadas com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/05 para classificação de uso da água do tipo 2 (Tabela 4). As concentrações dos metais Zn, Cu, Cr, Ni, Co, Ba e Al foram registradas dentro do permitido pela resolução CONAMA para águas de classes I e II em todos os tratamentos (Controle, Montante e Jusante), tanto no início, quanto no fim da exposição. Vale salientar ainda que os resultados expressos como abaixo do limite de detecção (LD), não significam, necessariamente, que não há a presença do metal analisado, esse pode apenas estar em uma concentração inferior a aquela detectada pelo método. Ademais, mesmo em baixas concentrações os efeitos da mistura de metais podem ser tóxicos nos organismos que são expostos a elas (YOLOGLU e OSMEN, 2015).

Enquanto as concentrações de Cd estavam acima do permitido pela resolução CONAMA em todos os tratamentos, e na natureza, o Cd pode ser encontrado associado aos Zn, Cu e Pb e é antropicamente utilizado como anticorrosivo em aço galvanizado, pigmentos em plásticos, pilhas e baterias recarregáveis, componentes eletrônicos e reatores nucleares, que podem contaminar águas de rios. E em água potável pode ser encontrado devido a sua presença como impureza do Zn de tubulações galvanizadas, soldas e acessórios metálicos (CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2013).

Além disso, os níveis de Mn na amostra Montante estavam acima do Controle, e na Jusante esses ultrapassaram os limites estabelecidos pela resolução CONAMA. de França *et al.* (2020), em seu trabalho, analisaram a água do rio Pirajibú

em dois pontos, um quando este adentra o território sorocabano e outro em seu encontro com o rio Sorocaba, dentro do que foi estabelecido como zona industrial, citado anteriormente neste trabalho. Nas quatro estações do ano e em ambos os pontos os autores registraram a presença dos metais Hg, As, Mn, Pb e Cd, sendo os níveis de Mn no outono mais altos do que aqueles valores estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357/2005, possivelmente devido as áreas industriais onde ocorre a poluição química e contaminação residual da galvanoplastia, somados aos problemas de resíduos.

A diminuição da concentração de alguns metais no final das exposições como Cr, K e Mn na Jusante, Ba e Cd na Montante e Jusante pode indicar que houve absorção do metal pelos animais, uma vez que os anfíbios podem absorver os metais diretamente da água por suas peles, que são altamente permeáveis (PAPADIMITRIOU e LOUMBOURDIS, 2002, FERNANDES *et al.*, 2021) ou pela alimentação.

Metais como o K, Mo e Sr não são abordados pela resolução CONAMA 357/05, impossibilitando assim um comparativo de valores e evidenciando a necessidade de mais testes que abordem a toxicidade desses compostos. Entretanto, os níveis de K foram maiores a Jusante tanto no início como no fim da exposição, o Mo esteve presente apenas no grupo Controle e o Sr foi registrado em todos os grupos com as concentrações mais altas no grupo Controle, tanto no início como no fim da exposição.

Os metais são considerados substâncias muito tóxicas devido à sua distribuição, persistência, acúmulo e biomagnificação nas cadeias alimentares com suas concentrações variando na água, sedimentos e organismos aquáticos (ATLI e CANLI, 2010, AUTHMAN *et al.*, 2012, KELEPERTZIS *et al.*, 2012, JAVED e USMANI, 2019, FERNANDES *et al.*, 2021). A biodisponibilidade e toxicidade dos metais são influenciadas pelas características física e química da água. Portanto, devido à escassez de estudos sobre a qualidade da água dos corpos d'água superficiais brasileiros e seus efeitos sobre os organismos aquáticos, torna-se urgente a avaliação de diferentes biomarcadores nos organismos aquáticos.

METAIS	LEGISLAÇÕES	CONTROLE		MONTANTE		JUSANTE	
		Início	Final	Início	Final	Início	Final
	CONAMA 357/2005 Águas classe II (mg/L)						
pH	6,0 –9,0	7,2	8,2	7,0	7,5	7,5	7,9
Al (mg/L)	0,100	<L.D	<L.D	<L.D	LD	0,008 ± 0,007	0,004±0,001
Ba (mg/L)	0,700	0,016± 0,001	0,016±0,001	0,014±0,001	0,009 ±0,001* ↓	0,0383± 0,002#*	0,015± 0,001#* ↓
Cd (mg/L)	0,001	<b>0,001± 0,002</b>	0,001 ± 0,001	<b>0,004±0,001</b>	0,001± 0,001 ↓	<b>0,009 ± 0,002#*</b>	0,001± 0,001 ↓
Co (mg/L)	0,050	<L.D	LD	<L.D	LD	<L.D	<LD
Cr (mg/L)	0,050	0,002± 0,001	0,001± 0,001	0,001±0,003	0,001±0,003	0,004 ± 0,001#	0,001± 0,001 ↓
Cu (mg/L)	0,009	0,001± 0,001	0,002± 0,001 ↑	<L.D	0,001± 0,001	0,002± 0,001#	0,001± 0,001
K (mg/L)	--	2,266 ± 0,143	3,894 ± 0,179 ↑	1,520± 0,101*	2,130± 0,064* ↑	8,988 ± 0,404#*	5,714± 0,337 ↓
Mn (mg/L)	0,1	0,002 ± 0,001	0,025 ± 0,001 ↑	0,023 ± 0,003*	0,033 ± 0,003* ↑	<b>0,490 ± 0,040#*</b>	<b>0,194 ± 0,019#* ↓</b>
Mo (mg/L)	--	<L.D	<L.D	<L.D	LD	<L.D	LD
Ni (mg/L)	0,025	<L.D	LD	<L.D	<L.D	<L.D	LD
Sr (mg/L)	--	0,262 ± 0,008	0,260 ± 0,006	0,020 ± 0,001*	0,040 ± 0,002* ↑	0,082 ± 0,003#*	0,060± 0,002#*
Zn (mg/L)	0,180	0,008 ± 0,012	0,034 ± 0,006 ↑	<L.D	0,001± 0,000*	<L.D	<LD

Tabela 4. Análises dos metais (Alumínio – Al, Bário – Ba, Cádmió – Cd, Cobalto - Co, Cobre - Cu, Cromo - Cr, Potássio - K, Manganês - Mn, Molibdênio – Mo, Níquel – Ni, Estrôncio – Sr e Zinco – Zn) em amostras de água do rio Pirajibú. Os valores dos metais são expressos como mg/L Os dados são comparados com a resolução CONAMA 357/05. Em negrito estão os valores acima do permitido pela resolução. \* indica diferença significativa em relação ao controle; # indica diferença significativa em relação aos pontos Montante e Jusante da Zona Industrial; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição; <LD = abaixo do limite de detecção. As colunas destacadas com “final” apresentam a análise da água após o período de exposição (96h).

A atividade da CAT foi maior, estatisticamente, nos grupos Montante e Jusante quando comparada ao grupo Controle. Sabe-se que a exposição de girinos a metais como o Cd, Cr, Cu, Pb e Zn provoca uma situação de estresse oxidativo e esse estresse pode ser avaliado a partir de alterações enzimáticas da CAT e da glutathione S-transferase (GST), por exemplo, que mostram uma resposta acentuada de acordo com a concentração desses metais (GARCÍA-ALONSO *et al.*, 2011, PELTZER *et al.*, 2013, FERNANDES *et al.*, 2021). Além disso, por ser uma enzima universal presente em todos os organismos vivos (CHELIKANI *et al.*, 2004), a CAT possui uma faixa de pH e temperatura ideal para a sua atividade, conseqüentemente, a atividade das enzimas que participam na defesa antioxidante, tais como a CAT, devem ser investigadas em anfíbios quando estes são expostos ao aumento da temperatura e as variações de pH no seu microhabitat (WEERATHUNGA e RAJAPAKSA, 2020).

Enquanto que a atividade da SOD foi menor nos grupos Montante e Jusante quando comparada ao grupo Controle. O Mn desempenha um efeito importante nos níveis dessa enzima, uma vez que esse está presente em sua composição, assim uma quantidade alta de Mn nas células pode ocasionar uma resposta positiva auxiliando na geração de novas moléculas de Mn-SOD (AGUIRRE e CULOTTA, 2012, VERONEZ *et al.*, 2016). No entanto, uma exposição crônica a esse metal pode ocasionar estresse oxidativo. Além disso, quando estão livres na célula, outros metais podem competir com o Mn na ligação com a SOD impossibilitando a síntese de novas moléculas, ocasionando assim uma diminuição em sua produção (AGUIRRE e CULOTTA, 2012, VERONEZ *et al.*, 2016). Estes efeitos também podem ser atribuídos ao Cd que está em alta concentração, além da presença de outros metais. Embora em níveis mais baixos os metais em conjunto podem ter sua ação potencializada e um efeito mais tóxico (VERONEZ *et al.*, 2016).

Os níveis de LPO foram menores nos animais expostos a água da Jusante comparados ao grupo controle, e isso pode ser um resultado da ação das enzimas SOD-CAT e a presença de metais, como observado por Carvalho *et al.* (2020) no rim de girinos de rãs-touro expostos a combinações de Zn, Cu e Cd. A LPO foi relatada como um dos principais contribuintes para a perda da função celular sob condições de estresse oxidativo (STOREY 1996) e um indicador de dano oxidativo de

componentes celulares. Neste estudo, os níveis de LPO foram avaliados pelo método de FOX que detecta diretamente os equivalentes de hidroperóxidos lipídicos, mas outra técnica muito utilizada é a do ácido tiobarbitúrico (TBARs) que mede os produtos finais da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) (HERMES-LIMA *et al.*, 1995). Dessa forma, mesmo que os valores apresentados estejam abaixo do grupo controle, não podemos ignorar a formação de outras espécies de radicais que não foram detectados pela técnica usada neste estudo.

No entanto, independentemente do método utilizado, esses resultados indicam que a exposição a água do rio Pirajibu pode promover aumentos significativos de radicais levando a estresse oxidativo no fígado de girinos de rãs-touro, como observado nos níveis de PCO. Comparativamente ao grupo Controle, houve um aumento da concentração de PCO no fígado dos animais expostos a água da Montante e da Jusante. Sabe-se que as EROs podem converter grupos amino de proteínas em porções carbonil (=CO) e alterar a estrutura e função de proteínas. Esses grupos carbonil podem ser introduzidos de diversas formas, mas principalmente pela oxidação catalisada por metais (REQUENA *et al.*, 2003), e sua formação é irreversível, ocasionando uma mudança na conformação de proteínas, diminuindo suas atividades catalíticas (ALMROTH *et al.*, 2005). Embora estudos com PCO e efeitos dos compostos químicos sejam importantes como biomarcadores de estresse oxidativo em girinos ainda são escassos. Alguns estudos demonstram que em baixa concentração de oxidantes a degradação de proteínas aumenta, enquanto em altas concentrações esses podem inibir a degradação proteolítica (GRUNE *et al.*, 2003), como observado em peixes (ALMROTH *et al.*, 2005) e girinos (FERNANDES *et al.*, 2021).

Em relação a MT, não houve diferença significativa entre os grupos controle e Montante X Jusante, e isso pode indicar que outros mecanismos enzimáticos e não enzimáticos estão atuando ou que a exposição não provocou efeitos tóxicos mensuráveis pela técnica escolhida, além disso, vale salientar que a indução e respostas dessas proteínas dependem não apenas da presença ou ausência de metais na água, mas também da dose, da espécie ou da via de exposição (ROMEO *et al.*, 2000, SANCHEZ *et al.*, 2005, MONTEIRO *et al.* 2009, CARVALHO *et al.*, 2012, 2015). Mesmo que a MT possua uma grande afinidade de ligação com os

metais Cu, Cd e Zn, alguns estudos observam uma correlação de aumento principalmente com o Cu, metal esse que não apresentou valores acima do permitido pela resolução CONAMA (COYLE *et al.*, 2002, COOPER e FORTIN, 2010).

ANÁLISE	CONTROLE	MONTANTE	JUSANTE
<b>CAT</b>	0,50±0,09	<b>0,61±0,04</b>	<b>0,60±0,007</b>
<b>SOD</b>	94,31±13,32	<b>78,33±13,16</b>	<b>75,56±9,94</b>
<b>LPO</b>	2,18±0,25	2,06±0,34	<b>1,41±0,22#</b>
<b>PCO</b>	0,94±0,18	<b>2,06±0,43</b>	<b>1,55±0,32</b>
<b>MT</b>	0,21±0,03	0,21±0,03	0,23±0,03

Tabela 5. Análises bioquímicas no fígado. Atividade da catalase (CAT, nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mg de proteína), superóxido dismutase (SOD, U por mg de proteína), e peroxidação lipídica (LPO, nmol por mg de proteína), proteínas carbonilas (PCO, nmol de carbonilas por mg de proteína) e metalotioneína (MT, como nmol SH por mg de proteína). Os valores são representados como média ± D.P.M. Em negrito indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle; # indica diferença significativa em relação aos pontos Montante e Jusante da Zona Industrial (p<0,05). n = 8.

Finalmente, a análise do Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores pode ser utilizada para analisar os efeitos toxicológicos de diferentes contaminantes e os riscos ambientais (Chagas *et al.*, 2020, Fernandes *et al.*, 2021) e apontou que os biomarcadores mais responsivos neste trabalho foram a PCO (0,5579), seguida de LPO (0,2138), SOD (0,1769) e CAT (0,1633) enquanto a MT teve o menor valor (0,0395) (Figura 6). Individualmente a PCO foi o biomarcador mais sensível, seguida pelas enzimas CAT-SOD e LPO, tanto a Montante como a Jusante.

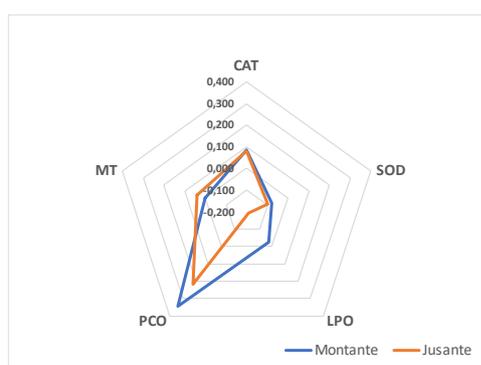


Figura 6: Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores

## 5. CONCLUSÃO

Embora a maioria dos metais esteja abaixo dos limites máximos estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05, foi possível observar diferenças significativas nas análises enzimáticas e não enzimáticas, evidenciando assim efeitos tóxicos dos metais com produção de EROs e a importância da execução de estudos que se propõem a verificar o efeito de misturas de metais em ambientes naturais. Além disso, há um risco evidente na fauna presente nas águas do rio Pirajibú, bem como na população que faz o consumo dessas águas, uma vez que até mesma a água da Montante mostrou resultados expressivos neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, S. A.; PERRE, C.; CHOI, Y. J.; TORNABENE, B. J.; SEPÚLVEDA, M. S.; LEE, L. S.; HOVERMAN, J. T. Larval amphibians rapidly bioaccumulate poly- and perfluoroalkyl substances. *Ecotox. Environ. Saf.*, 178, 137–145. 2019.

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

AGUIRRE, J.D., CULOTTA, V.C. Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* 287, 13541–13548. 2012.

AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluente exposure. *Bioch. Biophys. Acta* 1523, 37-48. 2000.

ALMROTH, B.C., STURVE, J., BERGLUND, A., FORLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171-180. 2005.

AKAHOKI, A., GABRYELAK, T., JÓZWIAK, Z., GONDKO, R. ZINC-INDUCED DAMAGE TO CARP (*Cyprinus Carpio L.*) ERYTHROCYTES IN VITRO. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 47, 1, 89-98. 1999.

American Society for Testing and Materials - ASTM. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. (E 729-96). In: *Annual Book of Standards*, v. 11.05, Section 11. Philadelphia, PA, 220-240. 2000.

American Veterinary Medical Association – AVMA. Report of the AVMA panel on euthanasia. *Journal of American Veterinary Society* 218, 669-696. 2001.

APHA / AWWA / WEF – Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Washington D.C., 2005.

ATLI, G, CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1884-1889. 2010.

ATTADEMO, A.M., PELTZER, P.M., LAJMANOVICH, R.C, CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C., JUNGES, C.M., BASSO, A. Biological endpoints, enzyme activities, and blood

cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 186, 635-649. 2014.

AUTHMAN, M.M.N., ABBAS, W.T., GAAFAR, A.Y. Metals concentrations in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from illegal fish farm in Al-Minufiya Province, Egypt, and their effects on some tissues structures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 163-172. 2012.

BAGNYUKOVA, T.V., CHAHRAK, O.I., LUSHCHAK, V.I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331. 2006. Beliaeff, B., Burgeot, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316-1322. 2002.

BARBIERATO, V. Caracterização hidromorfológica e diagnóstico da qualidade da água da sub bacia do rio Pirajibú. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Sorocaba, 2014.

BELIAEFF, B., BURGEOUT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1316-1322. 2002.

BILA, D.M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova* 26 (4), 523-530. 2003.

BÖLL, S., SCHMIDT, B. R., VEITH, M., WAGNER, N., RÖDDER, D., WEIMANN, C., KIRSCHEY, T., LÖTTERS, S. Anuran amphibians as indicators of changes in aquatic

and terrestrial ecosystems following GM crop cultivation: a monitoring guideline. *Bio. Risk.* 8, 39–51. 2013.

BOIARSKI, D. R.; TOIGO, C. M.; SOBJAK, T. M.; SANTOS, A. F. P.; ROMÃO, S.; GUIMARÃES, A. T. B. Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to water from an urban stream. Springer. 2020.

BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M.; ROTHERMEL, B. B. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. *Oecologia*, 129: 518–524. 2001.

BOONE, M.D., SEMLITSCH, R.D., LITTLE, E.E., DOYLE, M.C. Multiple stressors in amphibian communities: Effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological. Appl.* 17 (1), 291-301. 2007.

BRIDGES, C. M. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Arch. Environ. Com. Tox.* 39, 1, 91-96. 2000.

BRODEUR, J.C., SUAREZ, R.P., NATALE, G.S., RONCO, A.E., ZACCAGNINI, M.E. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1370-1380. 2011.

CALISI, A., ZACCARELLI, N., LIONETTO, M. G., SCHETTINO, T. Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: Application to the monitoring of soil heavy metal pollution. *Chemosphere*, 90, 2637–2644. 2013.

CAMPANHA, M.C., AWAN, A.T., DE SOUZA, D.N., GROSSELI, G.M., MOZETO, A.A., FADINI, P.S. A 3- year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. *Environ Sci. Pollut Res. Int.* 22 (10), 7936-7947. 2015.

CANABARRO, L., TOLEDO, M. T., BARRELLA, W. Peixes do Rio Piragibu-Mirim em Sorocaba/SP. *Revista Eletrônica de Biologia*, v.1, n.3, p.31-49, 2008.

CANDIOTI, J.V., NATALE, G.S., SOLONESKI, S., RONCO, A.E., LARRAMENDY, M.L. Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide aficida. *Chemosphere* 78, 249-255. 2010.

CARLSSON, G., TYDÉN, E. Development and evaluation of gene expression biomarkers for chemical pollution in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environ. Sci. Pollut. R.* 25, 33131-33139. 2018.

CARVALHO, C.S., BERNUSSO, V.A. ARAUJO, H.S.S., ESPINDOLA, E.L.G., FERNANDES, M.N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* 89, 60-69. 2012.

CARVALHO, C.S., BERNUSSO, V.A., FERNANDES, M.N. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquat. Toxicol.* 167, 220-227. 2015.

CARVALHO, C.S., UTSUNOMIYA, H.S.M., PASQUOTO, T., LIMA, R., COSTA, M.J., FERNANDES, M.N. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environ. Pollut.*, 221, 445-452. 2017.

CARVALHO, C.S., UTSUNOMIYA, H.S.M., PASQUOTO, T., COSTA, M.J., FERNANDES, M.N. Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196. 2020.

CATTANEO, R., MORAES, B.S., LORO, V.L., PRETTO, A., MENEZES, C., SARTORI, G.M.S., CLASEN, B., AVILA, L.A., MARCHESAN, E., ZANELLA, R. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 97-106. 2012.

CBH-SMT. Relatório de situação dos recursos hídricos-1995. Coord. Câmara Técnica de Planejamento e Gerenciamento dos Recursos Hídricos e Secretaria Executiva do Comitê da Bacia Hidrográfica dos Rios Sorocaba e Médio Tietê. Sorocaba: CETESB/Universidade de Sorocaba. 231p. 1997.

CHAGAS, B.R.C., UTSUNOMIYA, H.S.M., FERNANDES, M.N., CARVALHO, C.S. Metabolic responses in bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 233, 108768. 2020.

CHELIKANI, P.; FITA, L.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2004.

CIKCIKIGLU YILDIRIM, N.; AKSU, Ö.; TATAR, S.; YILDIRIM, N. The Use of *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) as a Test Species for Toxicity Evaluation of Municipal Wastewater Treatment Plant Effluents. *Pollution*, 6(1): 35-41, 2020.

COLLINS, J.P. E A. STORFER. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers. Distrib.* 9: 89-98. 2003.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. CETESB (São Paulo). Ficha de informação de toxicológica – FIT. Cádmio e seus compostos. 2013. Disponível em <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Cadmio.pdf>>. Acesso em 24 de jul. de 2021.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB (São Paulo). Sistema Infoáguas. 2019. Disponível em: <<https://servicos.cetesb.sp.gov.br/infoaguas/>>. Acesso em: 10 jun. 2021.

COMPANY, R., SERAFIM, A., BEBIANNO, M. J., COSSON, R., SHILLITO, B., FIALA-MÉDIONI, A. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377–381. 2004.

CONCEIÇÃO, F.T., SARDINHA, D.S., NAVARRO, G.R.B., ANTUNES, M.L.P., ANGELUCCI, V.A. Composição química das águas pluviais e deposição atmosférica anual na bacia do alto Sorocaba (SP). *Quim. Nova* 34 (4), 610-616. 2011.

CONCEIÇÃO, F.T., SARDINHA, D.S., GODOY, L.H., FERNANDES, A.M., PEDRAZZI, F.J.M. Influência sazonal no transporte específico de metais totais e dissolvidos nas águas fluviais da Bacia do Alto Sorocaba (SP). *Geochim. Bras.* 29 (1), 23-34, 2015.

Conselho Estadual do Meio Ambiente - CONSEMA – Resolução nº355, de 13 de julho de 2017. Porto Alegre, RS. 2017. Resolução Normativa N 17, de 3 de julho de 2014. Disponível em < [https://ww3.icb.usp.br/pes/wp-content/uploads/2019/10/Resolucao\\_Normativa\\_17.pdf](https://ww3.icb.usp.br/pes/wp-content/uploads/2019/10/Resolucao_Normativa_17.pdf)>. Acesso em 1 de jul. de 2021.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Conselho nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, de 18 de março de 2005. Brasília, DF. 2005. Disponível em < [http://rodadas.anp.gov.br/arquivos/Round9/sismica\\_R9/Legisla%C3%A7%C3%A3o/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CONAMA%20357-05.pdf](http://rodadas.anp.gov.br/arquivos/Round9/sismica_R9/Legisla%C3%A7%C3%A3o/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CONAMA%20357-05.pdf)>. Acesso em 3 de jul. de 2021.

CONVERSE S. J., GRANT E. H. C. A three-pipe problem: dealing with complexity to halt amphibian declines. *Biol. Conserv.* 236: 107-114. 2019.

COOPER, S., FORTIN, C. Metal and metallothionein content in bullfrogs: Study of a whole watershed impacted by agricultural activities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 391-399. 2010.

COSTA, M.J., MONTEIRO, D., OLIVEIRA-NETO, A.L., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicol.* 17, 153-163. 2008.

CORRÊA, C. J. P., TONELLO, K. C., FRANCO, F. S. Análise hidroambiental da microbacia do Pirajibu-Mirim, Sorocaba, SP, Brasil. *Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science*, Taubaté, v. 11, n. 4, p.943-953. 2016

COYLE, P., PHILCOX, J.C., CAREY, L.C., ROFE, A.M. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59:627–647. 2002.

CURMI, E., RICHARDS, K., FENNER, R., ALLWOOD, J. M., KOPEC, G. M., BAJŽELJ, B. An integrated representation of the services provided by global water resources. *J. Environ. Manage.*, [s.l.], 129, 456-462. 2013.

DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica. Relatório de Recursos Hídricos cadastrados e outorgados pelo DAEE. Disponível em <<http://www.aplicacoes.daee.sp.gov.br/usuarios/fchweb.html>>. Acesso em 17 de nov de 2021.

DA COSTA ARAÚJO, A. P., MALAFAIA, G. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? a study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*), *J. Hazard. Mater.* 2020.

DA COSTA ARAÚJO, A. P.; DE MELO, N. F. S.; DE OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; RODRIGUES, F. P.; FERNANDES, T.; VIEIRA, J. E. A.; ROCHA, T. L.; MALAFAIA, G. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. J. Hazard. Mater. 382:121066. 2020.

DALLE-DONNE, I., GIUSTARINI, D., COLOMBO, R., ROSSI, R., MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol. Med., 9 (4), 169-176. 2003.

DE FRANÇA, J. F., PICKLER, T. B., JOZALA, A. F., DOS SANTOS, C. A., BATISTA, B. L., PEDRON, T., VIEIRA, R. A. L., GROTTTO, D. Determination of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake. Environ. Monit. Assess. 192:21. 2020.

DE MOURA, A.G.L., MONTOYA, A.C.V., SILVA, B.G., RABELO, C.A.B.S., DOS SANTOS, C.E.D., MIRANDOLA, C.A.S., LOPES, J.C., DE GODOI, L.A.G., FUESS, L.T., ADORNO, M.A.T., DIAS, M.E.S., COSTA, R.B., GUERRERO, R.B.S., CARNEIRO, R.B., MOTA, V.T.F.V. Métodos de rotina para análises físico-químicas de águas residuárias tratadas por processos biológicos. LPB, SHS, EESC, USP. 2016.

FERNANDES, I.F., UTSUNOMIYA, H. S. M., VALVERDE, B. S. L., CASSIEL FERRAZ, J. V., FUJIWARA, G. H., GUTIERRES, D. M., DE OLIVEIRA, C., BELUSSI, L. F., FERNANDES, M. N., CARVALHO, C. S. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Chemosphere 275, 130000. 2021.

FERRARI, A., LASCANO, C.I., ANGUIANO, O. L., PECHEN DE D'ANGELO, A.M., VENTURINO, A. Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquat. Toxicol.* 93 (1), 37-44. 2009.

FERREIRA, C. M.; LOMBARDI, J. V.; MACHADO-NETO, J. G.; BUENO-GUIMARÃES, H. M.; SOARES, S. R. C.; SALDIVA, P. H. N. Effects of Copper Oxychloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73:465–470. 2004.

FORMICKI, G. STAWARZ, R., LUKAČ, B. PUTAŁA, A., KUCZKOWSKA, A. Combined effects of cadmium and ultraviolet radiation on mortality and mineral content in common frog (*Rana temporaria*) larvae. *J. Environ. Sci. Health A.* 43, 1174–1183. 2008.

FRANÇA, F. M.; BRAZIL DE PAIVA, T.; MARCANTÔNIO, A. S.; TEIXEIRA, P. C.; FERREIRA, C. M. Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *J. Environ. Sci. Health B.* 50, 406–410. 2015.

FROST, D. R. 2007. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.0. Electronic Database. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acesso em: mar. 2020.

GARCIA, T. A. Percepção da quantidade e qualidade da água nas comunidades alojadas às margens dos rios Sorocaba e Pirajibu. 2006. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Geociências Administração e Política de Recursos Minerais, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, 2006.

GARCÍA-ALONSO, J., GREENWAY, G. M., MUNSHI, A., GÓMEZ, J. C., MAZIK, K., KNIGHT, A. W., HARDEGE, J. D., ELLIOTT, M. Biological responses to contaminants in the Humber Estuary: Disentangling complex relationships. *Mar. Environ. Res.* 295-303. 2011.

GASPARIK, J., MASSANYI, P., SLAMECKA, J. FABIS, M., JURCIK, R. Concentration of Selected Metals in Liver, Kidney, and Muscle of the Red Deer (*Cervus elaphus*). *J. Environ. Sci. Health A.* A39, 8, 2105–2111. 2004.

GREEN, F. B.; EAST, A. G.; SALICE, C. J. Will temperature increases associated with climate change potentiate toxicity of environmentally relevant concentrations of chloride on larval green frogs (*Lithobates clamitans*)?. *Sci. Total Environ.* 682, 282–290. 2019.

GRUNE, T., MERKER, K., SANDIG, G., DAVIES, K.J.A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 709–718. 2003.

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

GUTTERIDGE, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact.* 91, 133-140. 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford. 936. 2005.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford. 2007.

HAMMOND, J. I.; JONES, D. K.; STEPHENS, P. R.; RELYEA, R. A. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. *Evol. Appl.* 2012.

HAYES TB, FALSO P, GALLIPEAU S, STICE M. The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp. Biol.* 213(6): 921-933. 2010.

HAZELL, D., CUNNINGHAM, R., LINDENMAYER, D., MACKAY, B., OSBORNE, W. Use of farm dams as frog habitat in an Australian agricultural landscape: factors affecting species richness and distribution. *Biol. Conserv.* 102, 155–169. 2001.

HEATWOLE, H.; WILKINSON, J.W. *Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. Baulkham Hill: Surrey Beatty & Sons. *Amphibian Biology*. 8, 327. 2009.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xilenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271-280. 1995.

HINOJOSA-GARRO, D., RENDÓN-VON OSTEN, J., DZUL-CAAMAL, R. Banded tetra (*Astyanax aeneus*) as bioindicator of trace metals in aquatic ecosystems of the Yucatan Peninsula, Mexico: Experimental biomarkers validation and wild populations biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 195, 110477. 2020.

ISACHENKO, A. G. Geographical roots of ancient civilizations (on the 120th anniversary of L.I. Mechnikov's Civilization and Great Historical Rivers). Part I. *Reg. Res. Russ.*, [s.l.], 1, 1, 91-98. 2011.

IUCN - International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. Version 2009.2. 2009. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em abr. 2020.

JAVED, M., USMANI, N. An overview of the adverse effects of heavy metal contamination on fish health. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 89 (2), 389-403. 2019.

JIANG, Z.Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange - Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids* 26, 777-860. 1991.

JONES, L., GOSSETT, D.R., BANKS, S.W., MCCALLUM, M.L. Antioxidant defense system in tadpoles of the american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) exposed to paraquat. J. Herpetol. 44 (2), 222-228, 2010.

JONES-COSTA, M.; FRANCO-BELUSSI, L.; VIDAL, F. A. P.; GONGORA, N. P.; CASTANHO, L. M.; CARVALHO, C. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; ABDALLA, F. C.; DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, C. OLIVEIRA, C. R.; SALLA, R. F. Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). Ecotox. Environ. Saf. 151, 184–190. 2018.

KELEPERTZIS, E., ARGYRAKI, A., VALAKOS, E., DAFTSIS, E. Distribution and accumulation of metals in tadpoles inhabiting the metalliferous streams of Eastern Chalkidiki, Northeast Greece. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63, 409-420. 2012.

KOHEN, R., E NYSKA, A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol. Pathol. 30(6), 620–650. 2002.

KOVACIK, A., ARVAY, J., TUSIMOVA, E., HARANGOZO, L., TVRDA, E., ZBYNOVSKA, K., CUPKA, P., ANDRASCIKOVA, S., TOMAS, J., MASSANYI, P. Seasonal variations in the blood concentration of selected heavy metals in sheep and their effects on the biochemical and hematological parameters. Chemosphere 168, 365-371. 2017.

KROHN, R. M., PALACE, V., SMITS, J. E. G. Metal Changes in Pre- and Post-metamorphic Wood Frog (*Lithobates sylvaticus*) Tadpoles: Implications for Ecotoxicological Studie. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2020.

LAM, P.K.S., GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Pollut. Bull., [s.l.], 46, 182-186. 2003.

LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.P., SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 233, 346–357, 1994.

LIEBLER, D.C., REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms (p141-171). In: Free Radic. Toxicol. 442. 1997.

LILLYWHITE, H. B.; ZIPPEL, K. C.; FARRELL, A. P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. Comp. Biochem. Physiol., Part A. 124, 369–382. 1999.

LOUMBOURDIS, N. S., KOSTAROPOULOS, I., THEODOROPOULOU, B., KALMANTI, D. Heavy metal accumulation and metallothionein concentration in the frog *Rana ridibunda* after exposure to chromium or a mixture of chromium and cadmium. Environ. Pollut. 145, 787-792. 2007.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N., VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comp. Biochem. Physiol., Part A. 166, 237–243. 2013.

MAJUMDER, D.; DAS, A.; SAHA, C. Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: a kinetic and structural evaluation, *Int. J. Biol. Macromol.* 104, 929-935. 2017.

MANFREDINI, F. N. Pagamento por serviços ambientais e a economia verde: Estudo de caso: Simulação da aplicação do programa do "Produtor de Água" na Bacia do Rio Pirajibú. 2015. 200 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita de Filho" - UNESP, Sorocaba, 2015.

MARGALEF, R. *Ecologia*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 1974.

MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I., Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6053. 1969.

MCDIARMID, R.W., ALTIG, R. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. Chicago University Press, Chicago, pp. 444.1999.

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. *J. Exp. Biol.* 93: 101-18. 1981.

MEMMERT, U., PEITHER, A., BURRI, R., WEBER, K., SCHMIDT, T., SUMPTER, J.P., HARTMANN, A. Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2), 442-452. 2013.

MONTEIRO, D.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 40–49. 2009.

MONTEIRO, D.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology* 19, 105-123. 2010.

NAGAJYOTI, P. C., LEE, K. D., SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216. 2010.

NICHOLLS, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C., *Enzymology and Structure of Catalases*, 2000. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=2ua9F01XZWYC&oi=fnd&pg=PA51&ots=uE2EaibWwy&sig=rgjJoK\\_h-C7FeSnljf7yrl1Sbol&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=2ua9F01XZWYC&oi=fnd&pg=PA51&ots=uE2EaibWwy&sig=rgjJoK_h-C7FeSnljf7yrl1Sbol&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)> Acesso em mar. 2021.

NÜßER, L.K., SKULOVICH, O., HARTMANN, S., SEILER, T-B., COFALLA, C., SCHUETTRUMPF, H., HOLLERT, H., SALOMONS, E., OSTFELD, A. A sensitive biomarker for the detection of aquatic contamination based on behavioral assays using zebrafish larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, [s.l.], 133, 271-280. 2016.

ODUM, E.P. *Ecologia*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 1988. 434p.]

OSSANA, N.A., CASTANE, P.M., POLETTA, G.L., MUDRY, M.D., SALIBIAN, A. Toxicity of Waterborne Copper in Premetamorphic Tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 84, 712-715. 2010.

OSSANA, N.A., CASTANE, P.M., SALIBAN, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 65 (3), 486-497. 2013.

OUELLET, M., BONIN, J., RODRIGU, J., DESGRANGES, J.L., LAIR, S. Hindlimb deformities (Ectromelia, Ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. J. Wildl. Dis. 95-104. 1997.

PAETOW, L.J., MCLAUGHLIN, J.D., PAULI, B.D., MARCOGLIESE, D.J. Mortality of American bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* infected by *Gyrodactylus jennyae* and experimentally exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis*. J. Aquat. Anim. Health, 25 (1), 15-26. 2013.

PAPADIMITRIOU, E., LOUMBOURDIS, N. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69, 885-891. 2002.

PARK, B.J., KIDD, K. Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of minkfrogs and green frogs in the wild and in situ. Environ. Toxicol. Chem. 24 (8), 2027-2036. 2005.

PARVEZ, S., RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112-117. 2005.

PAZOS, M., DA ROCHA, A.P., ROEPSTORFF, P., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. Fish proteins as targets of ferrous-catalyzed oxidation: identification of protein carbonyls by fluorescent labeling on two-dimensional gels and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 59 (14), 7962-7977. 2011.

PEAKALL, D. B., WALKER, C. H. The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. *Ecotoxicology* 3, 173-179. 1994.

PEDRAZZI, F.J.M., CONCEIÇÃO, F.T., SARDINHA, D.S., MOSCHINI-CARLOS, V., POMPÊO, M. Avaliação da qualidade da água no reservatório de Itupararanga, Bacia do Alto Sorocaba (SP). *Geociências* 33 (1), 26-38, 2014.

PELTZER, M. P., LAJMANOVICH, R. C., ATTADEMO, A. M., JUNGES, C. M., CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C., REPETTI, M. R., SIGRIST, M. E. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142-151. 2013.

PEREIRA, H. M., LEADLEY, P. W., PROENC, A. V., ALKEMADE, R., SCHARLEMANN, J. P., FERNANDEZ-MANJARRES, J. F., ARAUJO, M. B., BALVANERA, P., BIGGS, R. & CHEUNG, W. W., CHINI, L., COOPER, H. D., GILMAN, E. L., GUÉNETTE, S., HURTT, G. C., HUNTINGTON, H. P., MACE, G. M., OBERDORFF, T., REVENGA, C., RODRIGUES, P., SCHOLES, R. J., SUMAILA, U.

R., Walpole, M. Scenarios for Global Biodiversity in the 21st Century. *Science*. 330, 1496 -1500. 2010.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M., SOLONESKI, S., NIKOLOFF, N., NATALE, G.S., LARRAMENDY, M.L. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 15-24. 2015.

PISOSCHI, A. M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55-74. 2015.

POLJSAK, B., ŠUPUT, D., MILISAV, I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-11. 2013.

PRYOR, W. A.; HOUK, K. N.; FOOTE, C. S.; FUKUTO, J. M.; IGNARRO, L. J.; SQUADRITO, G. L.; DAVIES, K. J. A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *AJP-Regul Integr Comp Physiol.* 291. 2006.

RADHAKRISHNAN, M.V. Effect of cadmium on catalase activity in four tissues of freshwater fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). *Int. J. Vet. Med.* 7 (1). 1-4. 2008.

RADHAKRISHNAN, M.V. AND HEMALATHA, S. Effect on superoxide dismutase and catalase in erythrocytes of catfish (*Heteropneustes fossilis* Bloch.) exposed to cadmium. *Nat. Env. Poll. Tech.* 8, 33-35. 2009.

RADTKE, J.F., MARTINS, J.S., MACHADO, E.L. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em efluentes a partir da aquisição de imagens digitais utilizando smartphone. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, 9, 1, 21-34. 2019.

RATTNER, B. A. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology*, 18, 773-783. 2009.

REQUENA, J.R., LEVINE, R.L., STADTMAN, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 25, 221–226. 2003.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *INT. J. Radiat. Biol.* 65, 1, 27-33. 1994.

ROMEO, M., COSSON, R.P., GNASSIA-BARELLI, M., RISSO, C., STIEN, X., LAFAURIE, M. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Mar. Environ. Res.* 44, 275-284. 1997.

ROMEO, M., BENNANI, N., GNASSIA-BARELLI, M., LAFAURIE, M., GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* 48, 185-194. 2000.

RUAS, C.B.G., CARVALHO, C.S., ARAUJO, H.S.S., ESPINDOLA, E.L.G., FERNANDES, M.N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of three cichlid species from a polluted river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 86-93. 2008.

SAKURAGUI, M.M., PAULINO, M.G., PEREIRA, C.D.S., CARVALHO, C.S., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., FERNANDES, M.N. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ. Pollut.* 178, 41-51. 2013.

SANCHEZ, W., BURGEOT, T., PORCHE, J.-M., A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721-2725. 2013.

SANTANA, M. S., SANDRINI-NETO, L., NETO, F. F., RIBEIRO, C. A. O., DOMENICO, M. D., PRODOCIMO, M. M. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.*, [s.l.], 242, 449-461, 2018.

SAN JUAN, M. R. F., CORTELEZZI, A., ALBORNOZ, C. B., LANDRO, S. M., ARRIGHETTI, F., NAJLE, R., LAVARÍAS, S. M. L. Toxicity of pyrethroid cypermethrin on the freshwater snail *Chilina parchappii*: Lethal and sublethal effects. *Ecotox. Environ. Saf.* 196, 110565. 2020.

SANCHEZ, W., PALLUEL, O., MEUNIER, L., COQUERY, M., PORCHER, J.M., AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177-183. 2005.

SANTORE, R. C., MATHEW, R., PAQUIN, P. R., DITORO, D. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 133, 271–285. 2002.

SARDINHA, D.S., CONCEIÇÃO, F.T., BONOTTO, D.M., SALLES, M.H.D., ANGELUCCI, V.A. Avaliação do balanço anual de cátions e ânions na bacia do Alto Sorocaba (SP). Rev. Brasil. Geo., 38, 730-740. 2008.

SARMA, S. S. S., CORRAL-JÁCQUEZ, F. I., NANDINI, S., BRENA-BUSTAMANTE, P. Population level indicators of stress: Effects of two heavy metals (copper and mercury) on the growth of *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1830) (Rotifera: Lecanidae), J. Environ. Sci. Health A. 45:1, 32-36. 2010.

São Paulo. Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. Lei nº 16337, de 14 de dezembro de 2016. São Paulo, SP. 2016. Disponível em <<https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2016/lei-16337-14.12.2016.html>>. Acesso em 3 de jul. de 2021.

SBH - Sociedade Brasileira de Herpetologia. *Lista de espécies de Anfíbios do Brasil*. 2009. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>>. Acesso em maio 2020.

SHAHRAKI, S.; RAZMARA, Z.; SHIRI, F. A paramagnetic oxalato-bridged binuclear copper(II) complex as an effective catalase inhibitor. Spectroscopic and molecular docking studies. J. Mol. Struct. 1208, 127865. 2020.

SHI, Y.-B. Amphibian Meamorphosis. From Morphology to Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York. 2000.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.*, 7: 122–126. 2018.

SIEVERS, M., HALE, R., PARRIS, K. M., SWEARER, S. E. Impacts of human-induced environmental change in wetlands on aquatic animals. *Biol. Ver.* 2017.

SIEVERS, M., HALE, R., SWEARER, S. E., PARRIS, K. M. Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. *Conservation Biology*. 33, 389-402. 2018.

SIEVERS, M., HALE, R., PARRIS, K.M., MELVIN, S.D., LANCTÔT, C.M., SWEARER, S.E. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. *Sci. Total Environ.*, [s.l.], 693, 1-10. 2019.

SLABY S, MARIN M, MARCHAND G, LEMIERE S. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environ. Pollut.* 248:478-495. 2019.

SIMIC, M.G., TAYLOR, K.A., WARD, J.F., VON SONNTAG, C. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*; Plenum Press: New York. 1991.

SOLONESKI, S., DE ARCAUTE, C.R., LARRAMENDY, M.L. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(17), 17811-17821. 2016.

Sorocaba. Câmara Municipal de Sorocaba. Lei nº 11.022, de 16 de dezembro de 2014. Sorocaba, SP. 2014. Disponível em < <https://leismunicipais.com.br/a1/plano-diretor-sorocaba-sp>>. Acesso em 3 de jul. de 2021.

Sorocaba. Plano diretor da cidade de Sorocaba. Disponível em < <https://obras.sorocaba.sp.gov.br/wp-content/uploads/2018/09/mapa-02zoneamento-lei-110222014-ate-31-01-2017-republicaco.pdf>>. Acesso em 3 de jul. de 2021.

SOTOMAYOR, V., CHIRIOTTO, T. S., PECHEN, A. M., VENTURINO, A. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Phys.*, 119, 48–53. 2015.

STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 191-208. 2000.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Braz. J. Med. Res.* 29, 1715-1733. 1996.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Mitochondria, metabolic control and microRNA: Advances in understanding amphibian freeze tolerance. *Biofactors*. 1-9. 2019.

SUNG, C.-C., HSU, Y.-C., CHEN, C.-C., LIN, Y.-F., E WU, C.-C. Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2013.

TAO, S., WEN, Y., LONG, A., DAWSON, R., CAO, J., XU, F. Simulation of acid–base condition and copper speciation in the fish gill microenvironment. *Comput. Chem.* 25, 215-222. 2001.

TRUHAUT, R. *Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives.* *Ecotox. Environ. Saf.* 1,151-173. 1977.

U.S. EPA. 2007. Method 3015A: Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts, Revision 1. Washington, DC.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13(2):57-149. 2003.

VAN METER, R. J.; GLINSKI, D. A.; HONG, T.; CYTERSKI, M.; HENDERSON, W. M.; PURUCKER, S. T. Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. *Environ. Pollut.* 93, 262-268. 2014.

VASCONCELOS, S.M.L., GOULART, M.O.F., MOURA, J.B.F., MANFREDINI, V. BENFATO, M.S., KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova.* 30 (5), 1323- 1338. 2007.

VASCONCELOS, A. M.; DAAM, M. A.; RESENDE, J. C.; CASALI-PEREIRA, M. P.; ESPÍNDOLA, E. L. G. *Survival and development of bullfrog tadpoles in microcosms treated with abamectin.* Springer. 2017.

VERDADE, V.K., DIXO, M., CURCIO, F. F. Risks of Extinction of Frogs and Toads as a Result of Environmental Changes. *Estudos Avançados*. 24 (68): 161-172. 2010.

VERONEZ, A.C.S., SALLA, R.V., BARONI, V.D., BARCAROLLI, I.F., BIANCHINI, A., MARTINEZ, C.B.R., CHIPPARI-GOMES, A.R. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquat. Toxicol.* 174, 101-108. 2016.

VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F., FABRRI, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44, 1, 69-84. 1997.

VIARENGO, A., LOWE, D., BOLOGNESI C., FABBRI, E., KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281-300. 2007.

WALKER, C. H. Biomarker Strategies to Evaluate the Environmental Effects of Chemicals. *Environ. Health Perspect.* 106, 2, 613-620. 1998.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D.B. Principles of Ecotoxicology, second ed. Taylor and Francis, London, 2001. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=szTGbnooH7QC&oi=fnd&pg=PP1&ots=E7G1rzfAof&sig=ElqWVB4JoRT2EskzRYytpRa\\_vss&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=szTGbnooH7QC&oi=fnd&pg=PP1&ots=E7G1rzfAof&sig=ElqWVB4JoRT2EskzRYytpRa_vss&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false). Acesso em abr. 2020.

WALM ENGENHARIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL. Estudo de Viabilidade de Exploração, Recuperação e Preservação do rio Pirajibú. São Paulo, 1999. 241 p.

WEERATHUNGA, W. A. M. T.; RAJAPAKSA, G. The impact of elevated temperature and CO<sub>2</sub> on growth, physiological and immune responses of *Polypedates cruciger* (common hourglass tree frog). *Front. Zool.* 2020.

WHO (World Health Organization), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria, Geneva, 155. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>>. Acesso em mar. 2020.

WU, K., LUO, Z., HOGSTRAND, C., CHEN, G., WEI, C. C., LI, D. D. Zn stimulates the phospholipids (PL) biosynthesis via the pathways of oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stress in the intestine of freshwater teleost yellow catfish. *Environ. Sci. Technol.* 2018.

XU, M., CUI, Z., ZHAO, L., HU, S., ZONG, W., LIU, R., Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level, *Chemosphere.* 2018.

YE, H., ZANG, S., XIAO, H., ZHANG, L. Speciation and ecological risk of heavy metals and metalloid in the sediments of Zhalong Wetland in China. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 12, 115-124. 2015.

YOLOGLU, E., OSMEN, M. Low concentrations of metal mixture exposures have adverse effects on selected biomarkers of *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology*. 2015.

YOUNG, K.M., CRAMP, R.L., FRANKLIN, C.E. Each to their own: skeletal muscles of different function use different biochemical strategies during aestivation at high temperature. *J. Exp. Biol.* 216, 1012-1024. 2013.