

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Fábio Henrique da Silva

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DAS ÁGUAS DO RIO PIRAJIBÚ POR
ANÁLISES DE BIOMARCADORES EM GIRINOS DE RÃ-TOURO *Lithobates
catesbeianus* (Shaw, 1802)**

Sorocaba

2022

Fábio Henrique da Silva

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DAS ÁGUAS DO RIO PIRAJIBÚ POR
ANÁLISES DE BIOMARCADORES EM GIRINOS DE RÃ-TOURO *Lithobates
catesbeianus* (Shaw, 1802)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* de Sorocaba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte.

Coorientação: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho.

Sorocaba

2022

Silva, Fábio Henrique da

Avaliação ecotoxicológica das águas do Rio Pirajibú por análises de biomarcadores em girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) / Fábio Henrique da Silva -- 2022.
89f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte
Banca Examinadora: Silvia Pierre Irazusta, Tiago Palladino Delforno
Bibliografia

1. Anfíbios. 2. Bacia hidrográfica do Rio Sorocaba e médio Tietê. 3. Ecotoxicologia. I. Silva, Fábio Henrique da. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

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

DEDICATÓRIA

A minha família, sem eles eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Iolanda Cristina Silveira Duarte, que acreditou em mim, e aceitou ser minha orientadora, mesmo sabendo da minha disponibilidade limitada de horário no início do mestrado, visto que eu trabalhava em regime CLT. Muito obrigado Professora Iolanda!! Outros professores talvez teriam receio para me orientar nestas condições, o que é totalmente compreensível, pois hoje sei que um mestrado acadêmico exige dedicação análoga ao trabalho em uma empresa. Agradeço ainda os ensinamentos, paciência, atenção, por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) para a realização de algumas análises de água, e por conseguir parcerias com outros professores e laboratórios que viabilizaram o desenvolvimento do meu projeto.

A Professora Doutora Cleoni dos Santos Carvalho, minha coorientadora, pela atenção, ensinamentos, e por aceitar e moldar o meu projeto. Obrigado também por abrir as portas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) para a realização da minha pesquisa, disponibilizando toda a estrutura do laboratório, e o apoio dos outros alunos sob sua coordenação.

Aos colegas de laboratório Heidi Samantha e João Victor, por colaborarem tanto com os experimentos associados ao meu projeto. Sem a ajuda de vocês, o desenvolvimento da minha pesquisa não seria possível. Também agradeço ao Gabriel Hiroshi, por ter me ajudado na etapa de coleta dos órgãos dos girinos.

Aos meus pais Valtair Henrique e Rosa Maria, e ao meu irmão Marcos Henrique, por todo apoio e suporte na minha caminhada, e por serem fundamentais na minha formação como pessoa. Também agradeço a minha querida sobrinha Sofia Aparecida, que apesar de não entender muito o que eu faço, e mesmo sem fazer nada em especial, me traz tantas alegrias pelo simples fato de existir !

Aos meus amigos de longa data Erik, Josiana e Eligelcy, que assim como eu, aceitaram o desafio de conciliar a vida acadêmica com o trabalho profissional. Muito obrigado pelas dicas, trocas de experiências, e pela motivação nas horas em que batia o cansaço e a aflição.

Aos meus amigos Guilherme Henrique, Pablo Henrique e Vanderson Urbaiti, pela amizade, apoio, e cooperação nas horas em que precisei. Especificamente ao Vanderson, agradeço ainda por ter me ajudado na coleta de água no rio Pirajibú.

A Alpha New Engenharia, em especial ao Ricardo Sales e ao Fábio Lima, por aceitarem a flexibilização do meu horário no período em que trabalhei na empresa. Isso possibilitou eu

manter meu emprego, e realizar as atividades acadêmicas do mestrado. Por isso, meu reconhecimento e muito obrigado!

Ao Professor Doutor Nobel Penteado de Freitas da Universidade de Sorocaba (UNISO), e a Professora Doutora Belinda de Cássia Manfredini Silva (Centro Universitário SENAC Sorocaba), por elaborarem a carta de recomendação, que foi fundamental para eu ingressar neste programa de mestrado. Agradeço também o apoio, torcida, e por se colocarem a disposição para me ajudar. De forma específica ao Professor Doutor Nobel, obrigado ainda por disponibilizar os materiais e estudos relativos ao rio Pirajibú, os quais colaboraram muito para a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor Tiago Palladino Delforno (Instituto SENAI de Inovação em Biotecnologia), e a Professora Doutora Silvia Pierre Irazusta (FATEC Sorocaba) que aceitaram participar da minha banca, e forneceram contribuições muito importantes para esta dissertação.

A Professora Doutora Marcela Pellegrini Peçanha (UNISO Sorocaba), e a Professora Doutora Suzelei Rodgher (UNESP São José dos Campos), por aceitarem atuar como suplentes na minha banca.

A UFSCar Sorocaba, em especial ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, cuja estrutura e corpo docente me forneceram conhecimentos e experiências que vou carregar por toda a minha vida profissional e pessoal.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo a partir de outubro/2021.

A todos os meus amigos e familiares. Obrigado pela torcida e pelo apoio, inclusive a compreensão pelas vezes em que eu estava muito atarefado, e precisei recusar convites a festas, churrascos e passeios.

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido,
agora é hora de compreender mais para temer menos”*

Marie Curie

RESUMO

SILVA, Fábio Henrique. Avaliação ecotoxicológica das águas do Rio Pirajibú por análises de biomarcadores em girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), Km 110, 18052-780 Sorocaba, SP, Brasil, 2022.

O rio Pirajibú percorre a zona industrial de Sorocaba/SP, e recebe o descarte de efluentes de diversas empresas. Este rio enquadra-se como classe 2 segundo os critérios da Resolução CONAMA nº 357/2005, e do Decreto nº 8468/1976 do Estado de São Paulo. O enquadramento nesta classe, associado ao aspecto e características deste rio, permitem afirmar que suas águas não são capazes de provocar mortalidade aos organismos aquáticos, porém, os efeitos toxicológicos subletais ainda não foram estudados. Considerando esta lacuna, o presente estudo teve por objetivo promover uma avaliação ecotoxicológica, e da qualidade das águas do rio Pirajibú. Para tanto, foram realizadas coletas de água do rio à montante e à jusante da zona industrial. As amostras de água foram submetidas a análises de parâmetros físico-químicos. Os ensaios ecotoxicológicos, ocorreram pelas análises de biomarcadores no fígado de girinos de rã-touro, expostos por 96 horas às águas do rio Pirajibú. Os biomarcadores analisados compreenderam a glutatona reduzida (GSH – tripeptídeo), as enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona S-transferase (GST), e os metabólitos glicose, proteínas e triglicerídeos. Os resultados das análises de metais, e dos outros parâmetros físico-químicos analisados, indicaram que a água do rio à jusante da zona industrial, possui qualidade inferior à montante. Quanto aos biomarcadores, a atividade da enzima GPx foi significativamente menor no grupo montante ($6,94 \pm 0,99$ nanomoles de Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - NADPH oxidado / min / mg de proteína) em relação ao controle ($14,11 \pm 4,88$ nanomoles de NADPH oxidado / min / mg de proteína), enquanto que a GST possuiu atividade significativamente maior no grupo jusante ($53,674 \pm 11,47$ nanomoles Tioéter formado / min / mg de proteína) em comparação com o grupo controle ($36,42 \pm 7,98$ nanomoles de Tioéter formado / min / mg de proteína). Os outros biomarcadores não apresentaram alterações significativas entre o grupo controle, e os grupos expostos às águas do rio Pirajibú. Este resultado demonstrou que a exposição por 96 horas, não foi capaz de alterar a maior parte dos biomarcadores avaliados, mas não suficiente para descartar o potencial das águas deste rio em proporcionar estresse oxidativo, e outros efeitos subletais em girinos de rã-touro.

Palavras-chave: Anfíbios. Bacia hidrográfica do Rio Sorocaba e Médio Tietê. Ecotoxicologia. Xenobióticos.

ABSTRACT

SILVA, Fábio Henrique. Ecotoxicological assessment of the Pirajibú River water by biomarkers analysis in bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), Km 110, 18052-780 Sorocaba, SP, Brasil, 2022.

In Sorocaba/SP, the Pirajibú river courses the industrial zone of the city, and receives the effluents discharge from several companies. This river is classified as class 2, according to the criteria defined by Brazilian environmental law (CONAMA nº 357/2005), and State of Sao Paulo environmental law (Decree nº 8468/1976). The classification, appearance and characteristics, indicates that Pirajibú water does not result in mortality to aquatic organisms, however, the sublethal or toxicological effects have not been studied yet. Considering this gap, the present study aimed to promote an ecotoxicological and water quality assessment of the Pirajibú river. To perform it, water collections were carried out in the river at upstream and downstream from the industrial zone. The water samples were subjected to analysis of physicochemical parameters. The ecotoxicological tests were carried out through the analysis of biomarkers in the liver of bullfrog tadpoles, exposed for 96 hours to the waters of the Pirajibú river. The biomarkers analyzed include reduced glutathione (GSH - tripeptide), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), and the metabolites glucose, proteins and triglycerides. The metals and other physical chemical analyzes, indicated that the downstream of the industrial zone has a lower quality than the upstream point. Regarding the biomarkers analysis, the activity of the GPx enzyme was significantly lower in the upstream group (6.94 ± 0.99 nmol Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate - NADPH / min / mg protein) compared to the control (14.11 ± 4.88 nmol NADPH / min / mg protein), while GST had significantly higher activity in the downstream group (53.674 ± 11.47 nmol Tioéter / min / mg protein) compared to the control group (36.42 ± 7.98 nmol of nmol Tioéter / min / mg protein). In reference to others biomarkers, no significant changes were observed between the control organisms and those exposed to the waters of the Pirajibú river. This result demonstrated that exposure for 96 hours was not able to change most of the biomarkers evaluated, but not enough to rule out the potential of the waters of this river provide oxidative stress, and other sublethal effects in bullfrog tadpoles.

Keywords: Amphibians. Sorocaba River and middle Tietê watershed. Ecotoxicology Xenobiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Toxicocinética de diferentes substâncias nos organismos em geral.	25
Figura 2: Bacia Hidrográfica do rio Pirajibú.	35
Figura 3: Bacia Hidrográfica do rio Pirajibú – Detalhe para a hidrografia.	36
Figura 4: Uso e ocupação do solo na bacia hidrográfica do rio Pirajibú.	38
Figura 5: Fluxograma da metodologia de estudo aplicada.	39
Figura 6: Localização dos pontos de coleta das amostras de água no rio Pirajibú.	41
Figura 7: Localização dos pontos de monitoramento do rio Pirajibú pela CETESB.	49
Figura 8: Níveis de GSH e a atividade das enzimas GPx e GST no fígado de girinos de rã – touro expostos por 96 horas as águas do controle, e da montante e jusante do rio Pirajibú (N = 8 em cada grupo).	60
Figura 9: Concentração dos metabólitos: proteínas, glicose e triglicerídeos no fígado de girinos de rã – touro expostos por 96 horas as águas do controle, e da montante e jusante do rio Pirajibú.(N = 8 em cada grupo).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tributários do rio Pirajibú.	34
Tabela 2: Parâmetros de interesse para o rio Pirajibú.....	40
Tabela 3: Coordenadas UTM dos pontos de coleta das amostras de água no rio Pirajibú.	42
Tabela 4: Métodos de referência para análise, preservação e armazenamento das amostras. .	42
Tabela 5: Empresas que descartam efluentes no rio Pirajibú.	47
Tabela 6: Coordenadas UTM dos pontos de monitoramento do rio Pirajibú pela CETESB. .	50
Tabela 7: Análises físico-químicas das águas do rio Pirajibú antes e após o período de exposição por 96 horas dos girinos.....	52
Tabela 8: Monitoramento rio Pirajibú ponte SP 075 na divisa de Sorocaba e Itu.....	78
Tabela 9: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2015.....	80
Tabela 10: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2016.....	82
Tabela 11: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2017.....	84
Tabela 12: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2018.....	86
Tabela 13: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2019.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Ácido acetilsalicílico

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AChE – Acetilcolinesterase

Al - Alumínio

ALP – Alkaline phosphatases

ALT – Alanine transaminase

ANA – Agência Nacional de Águas

AST – Aspartate transaminase

ASTM – Associação Americana para Teste e Materiais

APHA – Associação Americana de Saúde Pública

Ba - Bário

CAT – Catalase

CaE – Carboxilesterase

Cd – Cádmi

CDBN – Cloro-2, 4-dinitrobenzeno

CEUA – Comitê do Conselho de Ética em Uso de Animais

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CL 50 – Concentração letal média

Co – Cobalto

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COOH – Grupo funcional carboxila

Cr – Cromo

Cu – Cobre

DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DDD – Diclorodifenildicloroetano

DDE – Diclorodifenildicloroetileno

DDT – diclorodifeniltricloroetano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FMO – Flavinas monooxigenases

GOD - Glicose Oxidase

GPx - Glutathiona peroxidase

GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GST – Glutaciona S-transferase
HCH – Hexaclorociclohexano
HCl – Ácido clorídrico
HPC – Hidroperóxido
HNO₃ – Ácido nítrico
IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza
K – Potássio
LD – Limite de Detecção
LDH – Lactato desidrogenase
LPX – Peroxidação lipídica
LQ – Limite de Quantificação
MAO – Monoaminooxidases
Mn – Manganês
Mo – Molibdênio
MT – Metalotioneínas
MXR – Proteínas resistentes a multixenobióticos
NBR – Norma Brasileira
N.D – Não Detectado
NH₂ – Grupo funcional amina
NH₄ – Amônia
Ni – Níquel
NO₂ – Nitrito
NO₃ – Nitrato
NOS – Óxido nítrico sintase
NO_x – Óxidos de nitrogênio
OD – Oxigênio dissolvido
OH – Grupo funcional hidroxila
Pb – Chumbo
PCB – Bifenila policlorada
PCO – Proteínas carbonilas
pH – Potencial hidrogeniônico
PO₄ – Fosfato

POD – Peroxidase

PTD – Fósforo Total Dissolvido

SAAE – Serviço Autônomo de Água e Esgoto

SH – Grupo funcional tiol, ou grupo sulfidrilo

SIG – Sistema de Informações Geográficas

SOD – Superóxido dismutase

Sr – Estrôncio

SULT – Sulfotransferases

UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USA EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UTM – Universal Transversa de Mercator (Sistema de Coordenadas Planas)

VMP – Valor Máximo Permitido

VOC – Compostos Orgânicos Voláteis

Zn – Zinco

γ GT – γ -glutamyltransferase

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1. ECOTOXICOLOGIA E BIOMARCADORES	21
3.1.1. Classes de Biomarcadores	22
3.1.2. Biomarcadores no Processo de Biotransformação dos Xenobióticos	23
3.1.3. Exposoma e os Biomarcadores	25
3.2. ECOTOXICOLOGIA EM ANFÍBIOS	26
3.2.1. Anfíbios – Classificação e Características Gerais	26
3.2.2. Efeitos Moleculares, Fisiológicos e Comportamentais em Anfíbios Decorrentes da Exposição a Agentes Xenobióticos	27
3.2.3. Exposição de Anfíbios aos Metais	28
3.2.4. Exposição de Anfíbios aos Pesticidas	31
3.2.5. Exposição de Anfíbios aos Fármacos	32
3.3. RIO PIRAJIBÚ	33
3.3.1. Hidrografia	34
3.3.2. Hidromorfologia	36
3.3.3. Vegetação e Uso e Ocupação do Solo	37
4. METODOLOGIA	39
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO USO E OCUPAÇÃO DO SOLO E DAS PROPRIEDADES DO MEIO FÍSICO NA BACIA DO RIO PIRAJIBÚ	40
4.2. COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA PARA ANÁLISE EM LABORATÓRIO	40
4.2.1. Procedimentos de Coleta, Preservação e Armazenamento das Amostras	42
4.3. EXPOSIÇÃO DOS GIRINOS DE RÃ TOURO ÀS ÁGUAS DO RIO PIRAJIBÚ, SEGUIDA DA ANÁLISE DOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES ÓRGÃOS	43
4.3.1. Protocolos Experimentais	44
4.3.2. Ensaio Enzimáticos e Não Enzimáticos	45
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. DADOS DO RIO PIRAJIBÚ DISPONÍVEIS NOS ÓRGÃOS AMBIENTAIS DE FISCALIZAÇÃO E CONTROLE	47
5.2. ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS EFETUADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA	51
5.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	56

5.3.1. Glutathione Peroxidase (GPx).....	56
5.3.2. Glutathione S-Transferase (GST)	57
5.3.3. Glutathione Reduzida (GSH)	58
5.3.4. Metabólitos – Proteínas, Glicose e Triglicerídeos.....	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS.....	65
APENDICE – A	78

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das sociedades sempre esteve vinculado à disponibilidade dos recursos hídricos. Analisando a história, é possível constatar que muitas civilizações antigas floresceram nas planícies de grandes rios, como o Nilo no Egito, Tigre e Eufrates na Mesopotâmia, e o rio Indo na Índia e Paquistão (ISACHENKO, 2011).

Os recursos hídricos são essenciais para a agricultura, indústria, bem como para as necessidades domésticas em geral. Além disso, sua importância também está relacionada à manutenção da homeostase dos ecossistemas, e de suas respectivas funções ambientais (CURMI *et al.*, 2013).

Os diversos usos e aplicações da água, associados a imprescindibilidade deste recurso para manutenção da vida no planeta, são suficientes para o estabelecimento de práticas, processos e políticas públicas que visem sua preservação. Todavia, fatores como a industrialização, crescimento demográfico, aumento da urbanização e expansão da agricultura, repercutiram entre outras coisas na poluição de muitos ecossistemas aquáticos (SHARLEY *et al.*, 2016).

Uma das maneiras de reconhecer a qualidade ambiental no meio aquático, se dá por meio do biomonitoramento, que consiste em utilizar organismos que atuam como bioindicadores ou sentinelas da poluição nestes ambientes. Dentre os bioindicadores nos ecossistemas marinhos e/ou fluviais, estão as plantas aquáticas, as comunidades planctônica e bentônica, além dos peixes e anfíbios (CERVENY *et al.*, 2016). Moschino *et al.* (2010), destacaram que os bioindicadores representam um excelente mecanismo para avaliar e monitorar os estressores ambientais de origem antrópica.

Quanto aos efeitos ecotoxicológicos da poluição no meio ambiente, estes podem ser agudos ou crônicos. As evoluções na legislação ambiental proporcionaram a diminuição dos episódios agudos de poluição, tais como a mortalidade de organismos aquáticos, mas não foram suficientes para identificar e controlar os efeitos toxicológicos crônicos (CONNON; GEIST; WERNER, 2012).

Os efeitos crônicos são decorrentes de concentrações subletais de contaminantes na água. Apesar de não resultarem na morte imediata dos indivíduos, a exposição contínua é capaz de alterar suas atividades funcionais e fisiológicas, o que ao longo do tempo pode prejudicar o equilíbrio e as funções do ecossistema (RODRIGUES; PARDAL, 2014).

Os efeitos toxicológicos agudos e crônicos, podem ser identificados através dos biomarcadores, que compreendem as alterações bioquímicas, moleculares, e fisiológicas, provocadas pela exposição aos xenobióticos, e podem ser determinados em fluidos corpóreos,

células, tecidos ou órgãos das espécies avaliadas (LAM; GRAY, 2003; SCHEEPERS; COCKER, 2019).

De acordo com Nüßer *et al.* (2016), a análise de biomarcadores colabora para a determinação da toxicidade de uma substância em um ambiente aquático, visto que as análises físico-químicas efetuadas para monitorar a qualidade das águas superficiais, são insuficientes para indicar a existência, ou potencial de efeitos adversos subletais nos organismos (LIVINGSTONE, 1993; GOSSET; FERRO; DURRIEU, 2016). Em vista disso, é possível pressupor que muitos corpos d'água, regularmente monitorados por análises físico-químicas convencionais, e cuja poluição não é expressiva ou reconhecida, são capazes de oferecer riscos toxicológicos às espécies que nele habitam.

No município de Sorocaba/SP, o rio Pirajibú, que é o principal afluente da margem direita do rio Sorocaba, cruza toda a zona industrial da cidade (GARCIA, 2006), e recebe o lançamento de efluentes de muitas indústrias da região. Este rio possui grande importância para o município em questão, sendo que um dos seus principais afluentes, o rio Pirajibú-mirim, alimenta a Represa do Ferraz (ou do Pirajibú), que é responsável pelo abastecimento de água para 10 % da população sorocabana (CORRÊA; TONELLO; FRANCO, 2016).

O Pirajibú é classificado como um rio de classe 2 em toda a sua extensão (CETESB, 2022), e de acordo com o Decreto Estadual 8468/1976, esta classificação possibilita a utilização de suas águas para abastecimento público, após tratamento convencional, irrigação de hortaliças ou plantas frutíferas, e a recreação de contato primário, que inclui natação, esqui-aquático e mergulho (SÃO PAULO, 1976).

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) promove a análise periódica das águas deste rio. Os resultados deste monitoramento, apresentados parcialmente no apêndice A, associados aos usos permitidos pela sua classificação, indicam que a concentração de poluentes não é capaz de impedir a sobrevivência da comunidade de espécies nativas neste rio. Por outro lado, apesar da inexistência de efeitos perceptíveis a curto prazo, os efeitos toxicológicos subletais, tais como alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, ainda não foram avaliados.

Considerando a ausência de estudos ecotoxicológicos no rio Pirajibú, e que o mesmo está vulnerável a receber contaminantes das empresas que descartam efluentes em sua calha, identifica-se a necessidade de avaliar se suas águas podem proporcionar efeitos subletais nos organismos aquáticos, sendo que a abordagem proposta neste trabalho é inédita para este rio.

Assim, este estudo teve por objetivo promover uma avaliação ecotoxicológica das águas do rio Pirajibú, nos pontos à montante e à jusante da zona industrial de Sorocaba, efetuando

também a análise de alguns parâmetros físico-químicos para avaliar a qualidade destas águas. A avaliação dos efeitos ecotoxicológicos, se baseou na análise de biomarcadores bioquímicos no fígado de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), os quais foram expostos às águas do rio por 96 horas, que é o período proposto pela American Society for Testing and Materials - ASTM (2000), para ensaios de toxicidade aguda em peixes, macroinvertebrados e anfíbios. Os biomarcadores analisados foram o tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH), as enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST), e os metabólitos glicose, proteínas e triglicerídeos.

Este estudo foi desenvolvido para verificar as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: A concentração de metais e dos outros parâmetros físicos – químicos analisados nas águas do rio Pirajibú, está de acordo, ou não é muito divergente dos padrões de qualidade estabelecidos pelo Decreto nº 8468/1976 do Estado de São Paulo, e pelas Resoluções CONAMA nº 357/2005 e nº 430/2011, para corpos d'água de Classe 2.

Hipótese 2: A qualidade da água do rio à montante da zona industrial de Sorocaba, é superior ao trecho situado à jusante desta.

Hipótese 3: A presença dos poluentes, mesmo que em concentrações aceitas pela legislação ambiental, altera os biomarcadores bioquímicos avaliados neste estudo.

Hipótese 4: Embora a concentração de poluentes no rio Pirajibú não resulte em letalidade aos organismos, a alteração dos biomarcadores pode indicar a existência de efeitos subletais, o que a longo prazo é capaz de resultar em prejuízos à saúde e/ou ao comportamento dos indivíduos, afetando inclusive o equilíbrio do ecossistema.

2. OBJETIVOS

Objetivo Principal

O objetivo principal deste estudo, foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos das águas do rio Pirajibú, através da análise de biomarcadores bioquímicos no fígado dos girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).

Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade da água do rio Pirajibú, nos pontos à montante e à jusante da zona industrial.
- Identificar as empresas que descartam efluentes neste rio, promovendo o levantamento dos seus ramos de atividade, a fim de conjecturar os contaminantes passíveis de serem lançados neste corpo d'água.
- Correlacionar a concentração de metais, e dos outros parâmetros físico-químicos analisados nas águas do rio Pirajibú, com os resultados das análises dos biomarcadores bioquímicos efetuadas no fígado dos girinos de rã-touro.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. ECOTOXICOLOGIA E BIOMARCADORES

A ecotoxicologia é uma ciência relativamente nova, sendo que este termo foi concebido por René Truhaut em 1969, durante um encontro do International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo na Suécia (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010).

A ecotoxicologia é definida como um ramo da toxicologia relacionado ao estudo dos efeitos tóxicos proporcionados pelos poluentes naturais ou sintéticos nos constituintes dos ecossistemas, o que abrange os animais (incluindo os seres humanos), vegetais, e as formas de vida microbianas, em um contexto integral (TRUHAUT, 1977). Diferentemente da abordagem feita com base nas análises físico-químicas, os ensaios ecotoxicológicos são capazes de reconhecer precocemente as alterações prejudiciais nos organismos expostos aos estressores ambientais (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010). Salienta-se que as alterações e efeitos subletais nos organismos, podem resultar em mudanças fisiológicas e comportamentais que prejudicam a homeostase de todo o ecossistema. Deste modo, a ecotoxicologia estuda os impactos proporcionados pelos contaminantes em todos os níveis de organização biológica, ou seja, desde as alterações observadas no nível sub-individual, até os desequilíbrios que ocorrem em um âmbito ecológico (BEKETOV; LIESS, 2012).

No que se refere ao nível sub-individual, as anomalias provocadas pela exposição aos xenobióticos e toxicantes podem ser indicadas pelos biomarcadores, que abrangem as respostas ou alterações bioquímicas, moleculares ou fisiológicas, que podem ser determinadas precocemente nas células, tecidos, órgãos e fluidos corpóreos dos organismos sob avaliação. Por se tratar de alterações incipientes, os biomarcadores indicam a presença dos contaminantes antes de seus efeitos se manifestarem nos indivíduos, o que permite prever os impactos adversos nos níveis biológicos superiores, tais como em populações, comunidades, e no ecossistema como um todo (SANTANA *et al.*, 2018).

É possível antecipar os impactos supraindividuais e ecológicos através dos biomarcadores, visto que os mesmos identificam os efeitos e alterações individuais e sub-individuais, que são as primeiras a se manifestar após a exposição aos toxicantes (BAUDOU *et al.*, 2019). Os biomarcadores têm sido muito utilizados para avaliar a exposição ambiental e ocupacional aos agentes tóxicos, sendo que a sua aplicação fora do contexto clínico é denominada como biomonitoramento (SCHEEPERS; COCKER, 2019). Alguns biomarcadores são específicos para um determinado grupo de substâncias químicas, enquanto outros indicam genericamente a presença, ou os efeitos de várias classes de contaminantes (LIONETTO *et al.*, 2003; STECKLING *et al.*, 2018).

Em sequência são apresentados exemplos de biomarcadores bioquímicos e moleculares:

- Anormalidades nucleares – Estes biomarcadores indicam efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos, que são representados por alterações e danos no DNA (LIU *et al.*, 2014);
- Enzimas antioxidantes – Estas enzimas têm a função de controlar os níveis de radicais e outras substâncias oxidantes, impedindo a ocorrência de danos oxidativos, que podem proporcionar morte celular e contribuir para o aparecimento de doenças. Exemplos destas enzimas são SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GPx (glutaciona peroxidase), GR (glutaciona redutase) e GST (glutaciona S-transferase) (GOMES *et al.*, 2017);
- Enzima NOS (óxido nítrico sintase) – Esta enzima é responsável pela síntese do NO (óxido nítrico), que é um mensageiro químico e radical essencial para vários processos fisiológicos, entre eles a neurotransmissão (PAUL *et al.*, 2016), e a vasodilatação (DOKKEN *et al.*, 2015). Assim, a enzima NOS atua como um biomarcador nos sistemas nervoso e circulatório;
- Enzima AChE (acetilcolinesterase) – A AChE é um biomarcador de neurotoxicidade, pois esta enzima promove a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (LIONETTO *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2019);
- Proteínas MXR (multixenobiotic resistance) – Estas proteínas representam um mecanismo de defesa contra os xenobióticos, e sua concentração é diretamente proporcional ao nível de contaminação (ASSEF; PRINZIO; HORAK, 2019);
- Índice de carbonilação de proteínas (PCO) – A oxidação de proteínas, que é indicada pelo conteúdo de proteínas carbonilas (PCO), tem sido utilizada para avaliar o estresse oxidativo resultante da exposição a substâncias químicas (LI *et al.*, 2010);
- Níveis de metalotioneína (MT) – MT são proteínas produzidas pelo organismo que se ligam a íons metálicos livres no organismo, reduzindo a biodisponibilidade dos mesmos, sendo importante para a homeostase de metais essenciais. Neste sentido, as MT protegem as células dos efeitos tóxicos oriundos dos metais, e atuam como biomarcadores da presença destes elementos no organismo (DAHMS-VERSTER *et al.*, 2019).

3.1.1. Classes de Biomarcadores

Os biomarcadores normalmente têm sido classificados em biomarcadores de exposição, de efeito, e de suscetibilidade (GROOPMAN, 2018).

Os biomarcadores de exposição representam os xenobióticos e seus metabólitos identificados nos tecidos, órgãos e fluídos corpóreos dos organismos avaliados. Os biomarcadores de efeito, por sua vez, configuram-se como as alterações bioquímicas ou fisiológicas associadas a exposição aos contaminantes, indicando a resposta ou interação do organismo com o agente tóxico (CHAOUSIS; LEUSCH; MERWE, 2018). Os biomarcadores de suscetibilidade, indicam os fatores genéticos ou adquiridos que influenciam a resposta do organismo após a exposição a um agente xenobiótico, e são influenciados pela genética, e por fatores externos como idade e o próprio ambiente onde o indivíduo está inserido. Neste sentido, os biomarcadores de suscetibilidade, explicam o motivo pelo qual os organismos da mesma espécie, podem apresentar reações diferentes sob uma mesma exposição ambiental (GROOPMAN, 2018).

Ainda no que se refere aos biomarcadores de exposição e de efeito, Louro *et al.* (2019) indicaram que a correlação entre estas duas classes de biomarcadores, contribui para o entendimento da relação dose-resposta de um xenobiótico no organismo, de modo que os biomarcadores de exposição indicam a dose da substância, enquanto os biomarcadores de efeito indicam as respostas do organismo. Estes biomarcadores, também podem ser utilizados para estimar ou identificar os riscos decorrentes de uma determinada exposição ambiental. Pelo método usual, os riscos são avaliados com base na resposta clínica obtida após o contato com o xenobiótico, sendo que a avaliação dos riscos através dos biomarcadores de exposição e efeito, tem apresentado maior eficácia (LOURO *et al.*, 2019).

3.1.2. Biomarcadores no Processo de Biotransformação dos Xenobióticos

Grande parte dos agentes xenobióticos são lipofílicos, sendo que no processo de biotransformação, estas substâncias são convertidas em compostos hidrossolúveis que permitem sua excreção pela urina (STRYDOM *et al.*, 2006; LÜCHMANN *et al.*, 2015). Os animais possuem mecanismos adequados de biotransformação, que em vertebrados ocorre principalmente através das enzimas presentes no fígado (LIVINGSTONE, 1998; SANTANA *et al.*, 2018). A biotransformação é composta por fases, e está associada ao processo de toxicocinética (KÜHNERT *et al.*, 2017). Cada fase da biotransformação possui enzimas específicas, as quais podem atuar como biomarcadores de efeito (LÜCHMANN *et al.*, 2015).

Na literatura científica, alguns autores dividem a biotransformação em duas fases, por outro lado, a maior parte dos artigos tem classificado este processo em três fases.

Na fase I, por meio de reações de oxidação, redução, hidratação e hidrólise, as enzimas inserem ou modificam o grupo funcional da substância, tornando-a polar e mais hidrofílica

(LIVINGSTONE, 1998; STRYDOM *et al.*, 2006). As principais enzimas, ou biomarcadores, que atuam na fase I da biotransformação, pertencem à família da enzima do citocromo P 450, que estão situadas no fígado (STRYDOM *et al.*, 2006).

Ainda em relação a fase I, Donato e Castell (2003) destacam que a transformação do xenobiótico em um composto mais hidrofílico, é importante para induzir a eliminação da substância no organismo. Todavia, neste processo, os metabólitos gerados podem ser mais reativos e tóxicos que a substância de origem.

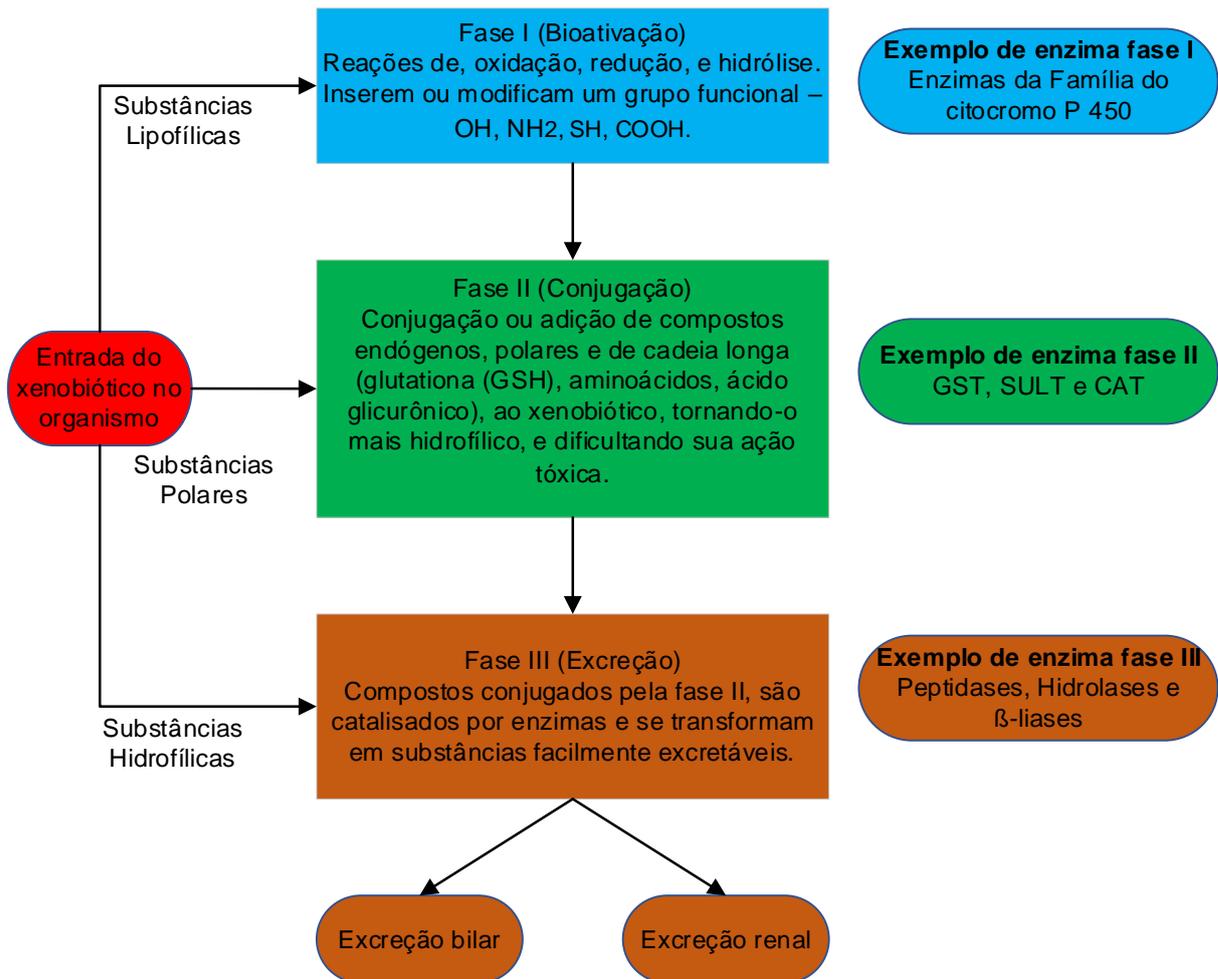
Na fase II, ocorre a conjugação do xenobiótico original, ou seus metabólitos, com um composto endógeno. Estas reações de conjugação são catalisadas por enzimas, e consistem na adição de compostos químicos de cadeia longa e polares, como aminoácidos e açúcares, aos xenobióticos. Assim, através das reações de conjugação, o composto adquire maior solubilidade, o que facilita sua eliminação pelo organismo (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Além de serem mais hidrossolúveis, os compostos conjugados normalmente são menos reativos e tóxicos que as substâncias não conjugadas (DONATO; CASTELL, 2003).

Em relação as enzimas que atuam na fase II da biotransformação, e configuram-se como biomarcadores, estão a glutathione S-transferase (GST), sulfotransferases (SULT), catalase (CAT), e a glucoronosil-transferase (UGT) (LÜCHMANN *et al.*, 2015). Além de catalisar as reações de conjugação, as enzimas de fase II também abrangem aquelas que protegem as células do estresse oxidativo associado as espécies reativas do oxigênio (ERO-s), dentre as quais pode-se destacar a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GPx (glutathione peroxidase) e GR (glutathione redutase) (STRYDOM *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2017).

Na fase III do processo de biotransformação, os compostos conjugados pela fase II são catalisados por enzimas como as peptidases, hidrolases e β -liases, e se transformam nas substâncias que serão excretadas, encerrando assim o processo de toxicocinética no organismo (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Embora a biotransformação seja composta por 3 fases, a toxicocinética de um xenobiótico depende da sua característica química. Tal como demonstrado na figura 1, as substâncias hidrofílicas são diretamente excretadas pelo organismo, enquanto as substâncias polares não sofrem bioativação (fase I), e o processo de biotransformação inicia-se na fase II.

Figura 1: Toxicocinética de diferentes substâncias nos organismos em geral.



Legenda: COOH (grupo funcional carboxila), NH₂ (grupo funcional amina), OH (grupo funcional hidroxila), SH (grupo funcional tiol).

Fonte: Adaptado de Strydom *et al.* (2006).

3.1.3. Exposoma e os Biomarcadores

O termo exposoma foi proposto em 2005 por Christopher Paul Wild (GHEZZI *et al.*, 2018). Por definição, o exposoma representa todas as exposições ambientais ocorridas durante a vida de um indivíduo, o que abrange do período pré-natal em diante (WILD, 2005). Como é conhecido, o desenvolvimento de doenças depende de fatores genéticos, e sofre influência dos estressores ambientais (SCHWARTZ; COLLINS, 2007). Neste sentido, Wild (2005) afirma que o genoma precisa ser complementado pelo exposoma para o estudo ou compreensão da etiologia das doenças.

A construção do exposoma de um indivíduo de uma determinada espécie, se dá através da correlação entre as características do ambiente externo, com as respostas identificadas nos órgãos, tecidos e fluídos corpóreos dos organismos, as quais se manifestam através dos

biomarcadores, e podem ser reconhecidos também pelas técnicas ômicas, como a transcriptômica, proteômica, e a metabolômica (GHEZZI *et al.*, 2018).

Assim, pode-se constatar que os biomarcadores de exposição e/ou de efeito podem fazer parte do exposoma de um indivíduo exposto a uma determinada condição ambiental, o que demonstra a relação entre estes dois conceitos.

Em seu trabalho de revisão, Steckling *et al.* (2018) afirmaram que no caso dos seres humanos, o exposoma já foi desvendado para estressores ambientais como metais, bifenilas policloradas (PCBs) e compostos orgânicos voláteis (VOCs). Por outro lado, o exposoma de muitas outras substâncias, tais como os óxidos de nitrogênio (NOx) e os materiais particulados, ainda precisam ser determinados.

3.2. ECOTOXICOLOGIA EM ANFÍBIOS

Com exceção da antártica, os anfíbios são encontrados em todos os continentes do planeta (FASOLA; RIBEIRO; LOPES, 2015), e até fevereiro de 2022 foram reconhecidas 8435 espécies de anfíbios em todo o mundo (AMPHIBIA WEB, 2022).

Os anfíbios são uma das espécies de vertebrados mais vulneráveis e ameaçadas pelos estressores ambientais de origem antrópica (SIEVERS *et al.*, 2019), e de acordo com Jones-Costa *et al.* (2018), a população de anfíbios tem sofrido um sério declínio em diferentes regiões do mundo, que é resultado de fatores como devastação dos seus habitats, aumento da radiação ultravioleta, aquecimento global, além da presença de contaminantes nos ecossistemas, especialmente nos ambientes aquáticos.

Em sua revisão, Sievers *et al.* (2019) afirmaram que muitos contaminantes presentes nos ecossistemas aquáticos, têm afetado o desenvolvimento e a sobrevivência da população de anfíbios, dentre os quais destacam-se os metais, pesticidas, hidrocarbonetos, fertilizantes e fármacos. Além disso, os anfíbios também têm sido afetados negativamente pela exposição aos microplásticos (HU *et al.*, 2018), e aos nanomateriais (AMARAL *et al.*, 2019).

3.2.1. Anfíbios – Classificação e Características Gerais

O nome anfíbios significa dois modos de vida (GENDRON, 2013), sendo referência ao fato de que a maior parte das espécies desta classe possui um ciclo de vida aquático, e outro em ambiente terrestre (FASOLA; RIBEIRO; LOPES, 2015). Os anfíbios são divididos em três ordens, sendo elas a anura, caudata (ou urodela) e a gymnophiona (CATENAZZI, 2015), e até fevereiro/2022, estavam catalogadas em todo o planeta 7453 espécies de anfíbios da ordem anura, 767 caudatos, e 215 da ordem gymnophiona (AMPHIBIA WEB, 2022). Fasola, Ribeiro e Lopes (2015) indicaram as seguintes peculiaridades e informações associadas aos anfíbios:

- Entre os vertebrados, os anfíbios possuem o maior grau de subdivisão da população, a qual pode ser mensurada pelos marcadores enzimáticos (aloenzimas), e pelos marcadores microsatélites.
- Populações de anfíbios normalmente apresentam diferenciação genética em distâncias geográficas relativamente curtas.
- Os hábitos alimentares e a fisiologia dos anfíbios, são diferentes nos ciclos aquático e terrestre.
- O duplo ciclo de vida, faz com que os anfíbios sejam expostos a uma grande variedade de contaminantes e estressores ambientais, o que repercute no fato desta classe ser a mais ameaçada entre os vertebrados.
- Em 2015 a IUCN – International Union for Conservation of Nature, indicou que aproximadamente 40 % das espécies de anfíbios estavam em declínio. Além disso, constatou-se que aproximadamente 30% dos anfíbios estão na lista vermelha da IUCN, o que significa que estas espécies estão vulneráveis, ameaçadas ou criticamente ameaçadas de extinção.

Jones-Costa *et al.* (2018), elenca algumas outras características que tornam os anfíbios mais suscetíveis aos estressores ambientais:

- A pele dos anfíbios é fina e muito permeável, o que é necessário para otimizar a respiração cutânea e o balanço osmótico. Todavia, esta característica facilita a absorção dos contaminantes nestes organismos.
- Os anfíbios, assim como os outros vertebrados ectotérmicos, possuem um metabolismo mais lento em relação às aves e aos mamíferos, o que repercute em menores taxas de depuração e catabolismo, e em uma maior bioacumulação de xenobióticos conseqüentemente.
- A suscetibilidade aos contaminantes é ainda maior nos girinos, uma vez que sua pele é altamente permeável, e o seu desenvolvimento se dá em águas superficiais sob mudanças morfológicas e fisiológicas em seu organismo, tornando-os mais vulneráveis aos estressores ambientais.

3.2.2. Efeitos Moleculares, Fisiológicos e Comportamentais em Anfíbios Decorrentes da Exposição a Agentes Xenobióticos

Muitas populações de anfíbios se desenvolvem em ambientes aquáticos, em áreas úmidas ou alagadas, situadas próximas a rodovias, complexos industriais ou áreas agrícolas, as quais possuem o potencial de liberar substâncias tóxicas no ambiente (SLABY *et al.*, 2019).

Sievers *et al.* (2017), apontaram que as anormalidades e a redução da sobrevivência dos anfíbios, têm sido mais observadas nas áreas úmidas e alagadas próximas as áreas urbanas, agrícolas, e de mineração.

Muitas anormalidades e outros efeitos subletais nos anfíbios, podem se dar inclusive em concentrações aceitas pelas legislações ambientais que dispõem sobre a qualidade de corpos d'água superficiais (YOLOGLU; OZMEN, 2015). Dentre as pesquisas desenvolvidas, pode-se destacar o estudo realizado por Dal-Medico *et al.* (2014), onde foi demonstrado que a performance cardíaca em girinos de rãs-touro, foi afetada após a exposição a uma concentração de cádmio permitida pela legislação ambiental brasileira.

Algumas anormalidades e alterações comportamentais, decorrentes da exposição aos tóxicos e xenobióticos foram apontadas por Sievers *et al.* (2019):

- Nado anormal, cujas alterações foram observadas nos anfíbios expostos aos pesticidas. Estas anormalidades abrangem diminuição na capacidade de fuga dos predadores, e o giro mais rápido durante a locomoção em água (DENOËL *et al.*, 2012).
- Alterações relacionadas ao processo de reprodução, que podem afetar eventos como a chamada de acasalamento, o tempo de resposta das fêmeas, e o próprio tempo da relação sexual.
- Alterações na alimentação, que entre outras coisas envolve o tempo de alimentação, e a frequência de ataques as presas.
- Redução no nível de atividade do organismo, proporcionadas principalmente por pesticidas, e por metais em menor proporção.

Além das mudanças comportamentais, a exposição dos anfíbios aos agentes xenobióticos pode provocar efeitos fisiológicos, e em nível molecular e celular, sendo que nestes últimos níveis, as alterações podem ser reconhecidas pelos biomarcadores (SLABY *et al.*, 2019).

3.2.3. Exposição de Anfíbios aos Metais

A contaminação por metais em ecossistemas aquáticos, úmidos e alagados, é um problema mundial, sendo que a persistência dos metais no ambiente, e a biomagnificação na cadeia alimentar, contribuem para este cenário. Os anfíbios podem absorver os metais na fase embrionária, visto que seus ovos sem casca são constituídos por uma membrana altamente permeável. Nos estágios larval (girinos), e fase adulta, a absorção dos metais ocorre via oral ou

dermal. Em vista destas características, os anfíbios atuam como bioindicadores efetivos da contaminação por metais (JAYAWARDENA *et al.*, 2017).

Alguns efeitos decorrentes da exposição dos anfíbios aos metais, foram descritos por Slaby *et al.* (2019), e abrangem a inibição do crescimento, microcefalia, encurvadura axial, brânquias mal desenvolvidas, além de anormalidades no nado de girinos.

Jayawardena *et al.* (2017), identificaram as alterações bioquímicas e histopatológicas, proporcionadas pela exposição de uma espécie de anfíbio indiana da ordem anura aos metais cádmio, cromo, cobre, chumbo e zinco, e dentre as alterações identificadas neste estudo, destacam-se as que ocorreram no fígado, cujo reconhecimento se deu através dos biomarcadores bioquímicos. Nesta pesquisa realizada, as alterações e lesões ao fígado, foram reconhecidas pelo aumento dos marcadores enzimáticos hepáticos aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), γ -glutamyltransferase (γ -GT) e alkaline phosphatases (ALP), que indicam a perda da integridade funcional e estrutural da membrana dos hepatócitos. Ainda em relação ao sistema hepático, verificou-se que a concentração das enzimas antioxidantes SOD, GPx, e GR, no fígado e no sistema circulatório, foi maior após a exposição aos metais (JAYAWARDENA *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Carvalho *et al.* (2017), girinos de rã – touro, *Lithobates catesbeianus*, foram expostos a águas com concentração de 1 μ g/L de zinco, cobre e cádmio, de forma combinada e isolada, sendo que o acúmulo destes metais foi observado em todos os órgãos avaliados, com as maiores concentrações nos rins, seguida do músculo e do fígado. Os níveis de metalotioneína (MT) também foram avaliados, e a exposição aos metais de forma isolada, ocasionou aumento deste biomarcador em todos os órgãos para os dois períodos (2 e 16 dias de exposição), sendo no fígado o aumento mais acentuado. A exposição combinada aos metais, também aumentou a MT no fígado e nos músculos após 16 dias de exposição, enquanto que nos rins, a alteração observada foi a diminuição dos níveis de MT. Além do acúmulo de metais nos órgãos, e da alteração dos níveis de MT, Carvalho *et al.* (2017) também constataram que a exposição aos metais influenciou na redução das células de defesa, e na melhora do sistema de transporte de oxigênio, a qual se deve ao aumento da demanda de O₂ provocada pela exposição a este xenobiótico.

Nos estudos derivados de Carvalho *et al.* (2017) e Chagas *et al.* (2020), constatou-se a alteração das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH), e dos metabólitos glicose, proteínas e triglicerídeos, após exposição a 1 μ g/L dos metais zinco, cobre e cádmio, por 2 e 16 dias. Os resultados obtidos, demonstram que a exposição aos metais de forma combinada foi a mais tóxica, pois os biomarcadores indicaram que esta combinação

apresentou maior potencial em proporcionar alterações metabólicas nos organismos. No estudo de Carvalho *et al.* (2020), foi verificado que a exposição a estes mesmos metais de forma isolada ou combinada, afetou a atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), e Glutathione S -Transferase (GST) no fígado, rins e músculo de girinos de rã-touro expostos por 2 dias. Os autores observaram também que a exposição combinada aos metais, aumentou os níveis da glutathione reduzida (GSH), e do conteúdo de peroxidação lipídica (LPO), e que a atividade da acetilcolinesterase (Ache) aumentou no cérebro após 2 dias de exposição, e diminuiu no cérebro e nos músculos após 16 e 2 dias de exposição respectivamente. Apesar das diferentes respostas dos biomarcadores nos órgãos e tecidos avaliados, o sistema antioxidante foi sensível aos metais, sobretudo nas situações onde os três metais estavam presentes de forma combinada.

Outra pesquisa associada a exposição aos metais, foi a realizada por Pinto-Vidal *et al.* (2021), os quais constataram que rãs – touro em estágio pré-metamórfico (girinos), sofreram alterações metabólicas, imunológicas, e histopatológicas após a exposição às águas com 2,5 mg/L de lítio, e 0,01 mg/L de selênio, ambas concentrações aceitas pela legislação ambiental brasileira. Neste estudo, observou-se que os grupos de animais expostos às águas com lítio (isolado e combinado com o selênio), apresentaram após 7 dias, um aumento na ordem de 31% na concentração da glicose no fígado em relação ao grupo controle. Por outro lado, com 21 dias de exposição, a concentração de glicose no fígado destes grupos de organismos foi similar ao grupo controle, sendo de aproximadamente 20 mg/dL, o que indica o retorno da homeostase da glicose, e sugere que as altas concentrações nos primeiros dias da exposição, ocorrem em função da elevada demanda energética para a eliminação destes metais no organismo. Complementarmente, destaca-se que o grupo exposto as águas com 0,01 mg/L de selênio, não apresentou alterações em relação ao controle após 7 dias de exposição, mas após 21 dias, foi observada uma diminuição significativa comparada ao controle, onde o autor destaca que este é o primeiro estudo onde a concentração de glicose diminuiu no fígado de anfíbios, uma vez que o selênio está associado ao aumento do glicogênio neste órgão. Ainda em relação a esta pesquisa, foi constatado que os organismos expostos ao lítio e ao selênio, de forma isolada ou combinada, apresentaram um aumento em torno de 23% na concentração de triglicérides no fígado após 7 e 21 dias de exposição, o que demonstra a mobilização deste lipídeo para o processo de eliminação dos metais, ao mesmo tempo que reflete a diminuição das reservas de triglicérides nestes animais, o que por sua vez pode comprometer o seu desenvolvimento para a fase adulta.

Além dos efeitos crônicos e subletais, identificados em nível celular e molecular, a exposição aos metais também pode ocasionar letalidade aos organismos expostos.

Normalmente a morte de indivíduos em um ecossistema está associado a concentrações elevadas de metais. Todavia, em seu estudo, Yologlu e Ozmen (2015) observaram que a combinação de dois ou três metais, com concentrações iguais a Concentração Letal (CL 50) e ao CL 50/2, proporcionaram a morte de girinos de *Xenopus laevis* utilizados nos experimentos. Este estudo testou combinações possíveis com os metais chumbo, cádmio e cobre, e por serem aplicados os valores do CL 50 e do CL 50/2, as concentrações individuais de cada metal estavam abaixo do permitido pela legislação ambiental europeia, indicando portanto, que a mistura de contaminantes que ocorre no meio ambiente, pode ter um efeito sinérgico maior que a concentração individual destes elementos.

Neste sentido, considerando a pesquisa desenvolvida por Yologlu e Ozmen (2015), percebe-se a necessidade e importância de avaliar os efeitos provocados pela mistura de metais e outras substâncias, visto que a combinação de dois ou mais contaminantes, com concentrações individuais consideradas seguras, podem representar riscos ecotoxicológicos aos anfíbios ou outros organismos expostos.

Ainda no que se refere aos valores estabelecidos pela legislação ambiental, é preciso considerar que as concentrações permitidas podem configurar riscos, mesmo que para um parâmetro de forma individual. Como já abordado, Dal-Medico *et al.* (2014), constataram que a concentração de cádmio permitida pela legislação ambiental brasileira, é capaz de afetar a performance cardíaca em girinos de rãs-touro, e Fernandes *et al.* (2021), verificaram que a concentração de metais (alumínio, cobre, manganês e zinco) na água e no sedimento do rio Sorocaba atendeu os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005, no entanto, mesmo enquadrando-se à legislação ambiental, os girinos de rãs-touro expostos a estas águas por 96 horas, apresentaram estresse oxidativo, o qual foi associado a presença dos metais.

3.2.4. Exposição de Anfíbios aos Pesticidas

Os anfíbios não são as espécies-alvo dos pesticidas, e apesar disso, os impactos dos pesticidas nos anfíbios é um fato mundialmente difundido, e que tem sido cada vez mais discutido e pesquisado (ALDRICH *et al.*, 2016), uma vez que a agricultura e a urbanização, têm aumentado a concentração e a mistura dos pesticidas nos ecossistemas aquáticos (NOWELL *et al.*, 2014). Güngördü, Uçkun e Yoloğlu (2016) destacam que muitos locais onde os anfíbios normalmente habitam, como lagos em áreas agrícolas, e áreas alagadas rasas em

florestas, normalmente possuem maiores concentrações de pesticidas em relação a grandes corpos d'água.

A exposição dos anfíbios aos pesticidas pode repercutir em efeitos reprodutivos, morfológicos e comportamentais. Em sua revisão, Slaby *et al.* (2019) destacam alguns destes efeitos, dentre os quais pode-se destacar o edema facial, formação de bolhas, encurtamento axial, cauda dobrada em girinos, diminuição da velocidade de natação, gônadas anormais nos organismos machos, e alterações na chamada de acasalamento.

Quanto aos efeitos subletais em nível molecular, Güngördü, Uçkun e Yoloğlu (2016), apontam que os efeitos da exposição a pesticidas como o glifosato e a metidationa, podem ser identificados pela alteração das enzimas GST, GR, AChE, carboxilesterase (CaE), AST e lactato desidrogenase (LDH). Além disso, Mann *et al.* (2009) destacam que a exposição a pesticidas como DDT (diclorodifeniltricloroetano), aldrin, dieldrin, atrazina, metribuzina, endossulfan, lindano e aldicarbe é capaz de suprimir o sistema imunológico dos anfíbios, o que conseqüentemente diminui a resposta de defesa aos agentes patogênicos. Estes mesmos autores também descreveram alguns biomarcadores e ensaios que indicaram a imunossupressão nos anfíbios, dentre os quais pode-se destacar a contagem de células brancas no sangue e de células fagocíticas, ensaios da capacidade fagocítica e lítica de células polimorfonucleares, ensaios de anticorpos como a resposta humoral a antígenos, e ensaios para avaliar a resposta inflamatória mediada pelas células T em anfíbios.

3.2.5. Exposição de Anfíbios aos Fármacos

Os benefícios associados ao correto uso de medicamentos para a saúde humana são incontestáveis (BLENKINSOPP *et al.*, 2017). Todavia, devido ao uso intensivo, muitos medicamentos podem alcançar o meio ambiente principalmente através do esgoto doméstico, industrial e oriundo de hospitais (KOUMAKI; MAMAIS; NOUTSOPOULOS, 2017). Atualmente os produtos farmacêuticos configuram-se como contaminantes emergentes, sendo que o seu lançamento no ambiente pode representar riscos, sobretudo aos organismos com habitat em ecossistemas aquáticos (MELVIN, 2016). O tratamento e a diluição dos efluentes, fazem com que a maioria dos fármacos ocorram em concentrações traço nos corpos d'água (MURRAY *et al.*, 2010). Por outro lado, como a maior parte dos medicamentos proporcionam efeitos nos seres humanos em baixas concentrações, os anfíbios e outros organismos aquáticos, podem ser afetados negativamente pela presença dos fármacos no meio ambiente, ainda que diluídos em pequenas concentrações, sendo que este cenário se agrava com a mistura e interações que ocorrem entre estas substâncias (MELVIN, 2016).

No que tange aos efeitos nos anfíbios decorrentes da exposição aos fármacos, estes podem se dar em nível molecular, morfológico e comportamental (PÉREZ-ALVAREZ *et al.*, 2018). Amaral *et al.* (2018), observaram os efeitos morfológicos e comportamentais em girinos de rã-touro expostos a uma mistura de medicamentos, sendo eles amoxicilina, ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco de sódio, ibuprofeno, fluoxetina, clonazepam, metamizol (dipirona sódica) e ranitidina. Entre os efeitos observados pode-se destacar a anormalidade na natação, diferente do padrão serpentino do nado destas espécies, o que demonstra um dano nos mecanismos nervosos que regulam a locomoção dos girinos, e afeta sua resposta na fuga aos predadores. A exposição a mistura de medicamentos também afetou a mandíbula e na dentição dos girinos, o que é potencialmente prejudicial à alimentação destes organismos. Além das alterações comportamentais e morfológicas, a exposição a mistura de medicamentos também resultou em anormalidades nucleares nos eritrócitos dos girinos de rãs-touro, indicando um potencial de mutagenicidade (AMARAL *et al.*, 2018).

No que diz respeito as implicações bioquímicas e moleculares, Pérez-Alvarez *et al.* (2018) observaram que os danos oxidativos nas larvas de duas espécies de anfíbios (*Xenopus laevis* e *Lithobates catesbeianus*), foram constatados através do aumento da concentração dos seguintes biomarcadores – conteúdo de hidroperóxido (HP), lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO), e índice de carbonilização de proteínas (PCO). Além disso, também foram observados nestes organismos o aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

3.3. RIO PIRAJIBÚ

Como destacado, além de ser o principal afluente da margem direita do rio Sorocaba, a importância do rio Pirajibú se dá em função de sua bacia hidrográfica estar relacionada ao abastecimento público de água para 10% da população sorocabana (GARCIA, 2006; CORRÊA; TONELLO; FRANCO, 2016). O rio Pirajibú está inserido na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos número 10, UGRHI 10 – Tietê/Sorocaba (SÃO PAULO, 2016). Sua nascente está situada perto da divisa entre Sorocaba e Alumínio, a uma altitude próxima aos 1.000 metros. Com cerca de 43 km de extensão, e após cruzar a zona industrial da cidade, sua foz se dá no rio Sorocaba, a aproximadamente 540 metros de altitude (MANFREDINI, 2015).

Em sequência estão descritas a hidrografia, hidromorfologia, vegetação, e uso e ocupação do solo relativas ao rio Pirajibú e sua bacia.

A despeito de sua importância, deve-se levar em conta que o Pirajibú é um rio regional e não muito extenso, o que repercute na carência de artigos científicos associados a este curso d'água. Neste sentido, além dos poucos artigos encontrados, a descrição das características do

rio Pirajibú se baseou em dissertações de mestrado, e no “Estudo de Viabilidade de Exploração, Recuperação e Preservação do Rio Pirajibú”, elaborado pela empresa Walm Engenharia e Tecnologia Ambiental no ano de 1999, que foi contratada pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) de Sorocaba. Apesar do ano de elaboração, e do carácter predominantemente técnico, isto é, sem cunho acadêmico, este estudo possui informações relevantes, especialmente no que tange a hidrografia e geomorfologia da bacia do rio em questão.

3.3.1. Hidrografia

A bacia hidrográfica do rio Pirajibú drena parcialmente os municípios de Sorocaba, Itu, Alumínio e Mairinque. A área de drenagem é de aproximadamente de 41.400 hectares, e os cursos d’ água desta bacia possuem cerca de 540 km de comprimento (MANFREDINI, 2015). O referido rio recebe a contribuição de vários afluentes, onde todos os afluentes da margem esquerda estão situados no município de Sorocaba, enquanto os da margem direita, com exceção do ribeirão Tapera Grande, estão situados inteiramente nos municípios vizinhos, sendo eles Itu, Mairinque e Alumínio (WALM, 1999). No estudo desenvolvido por Walm (1999), estão descritos todos os tributários do rio Pirajibú (Tabela 1).

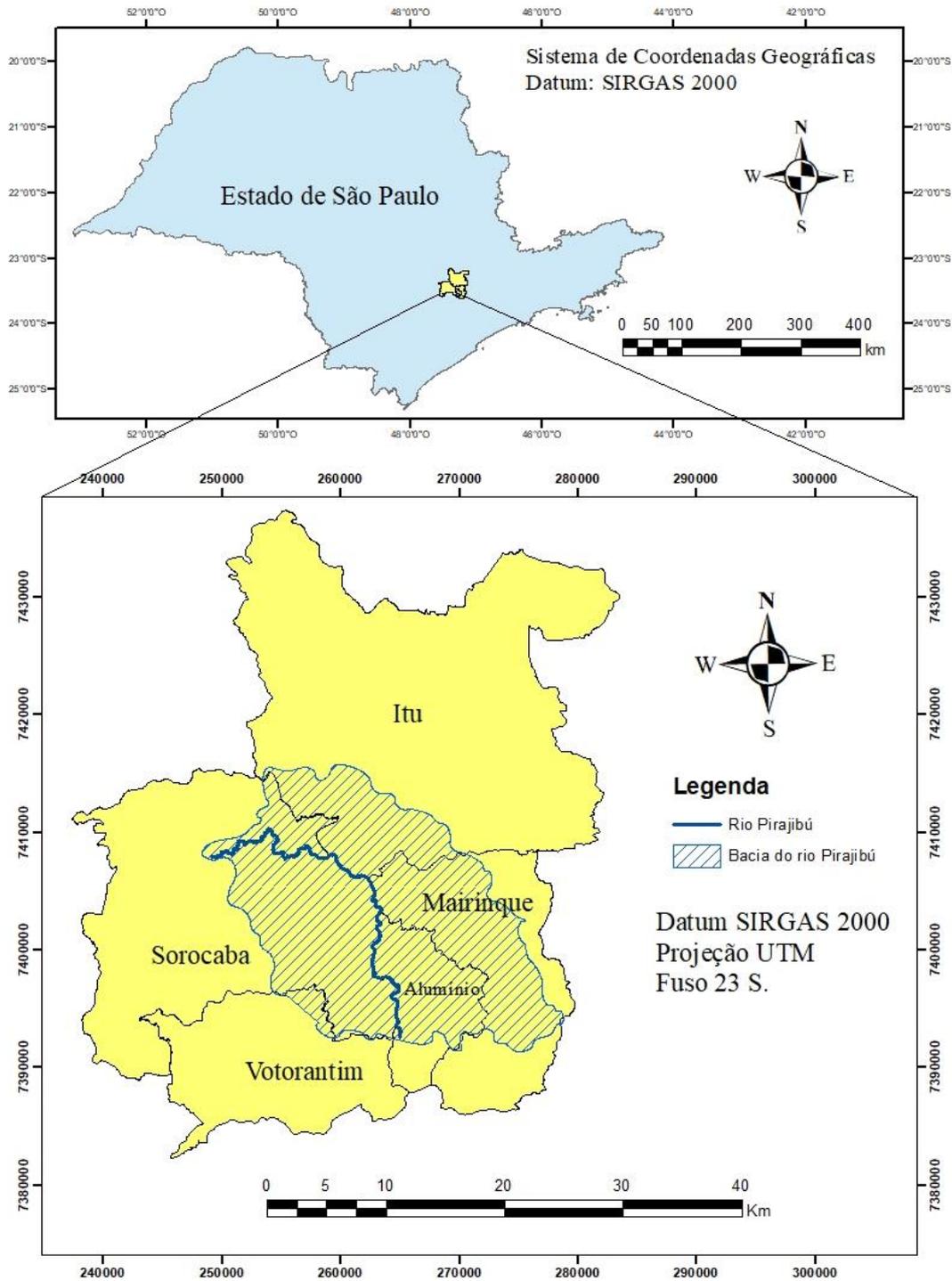
Tabela 1: Tributários do rio Pirajibú.

Nome do curso d’água	Posição em relação ao rio Pirajibú	Extensão	Área de drenagem	Municípios da bacia de drenagem
Ribeirão Tapera Grande	Margem direita	5,8 km	36 km ²	Itu e Sorocaba.
Ribeirão Varejão	Margem direita	5,5 km	47 km ²	Itu
Ribeirão Mato Dentro	Margem direita	20 km	52 km ²	Alumínio e Mairinque
Ribeirão do Varjão	Margem direita	27 km	110 km ²	Alumínio e Mairinque
Ribeirão Itagaraguataú	Margem esquerda	11,5 km	24 km ²	Sorocaba
Rio Pirajibú-Mirim	Margem esquerda	28 km	58 km ²	Sorocaba
Córrego Aparecidinha	Margem esquerda	6 km	30 km ²	Sorocaba

Fonte: Elaborado a partir de Walm (1999).

As figuras 2 e 3 demonstram a delimitação da bacia hidrográfica do rio Pirajibú, e na figura 3 a hidrografia encontra-se detalhada.

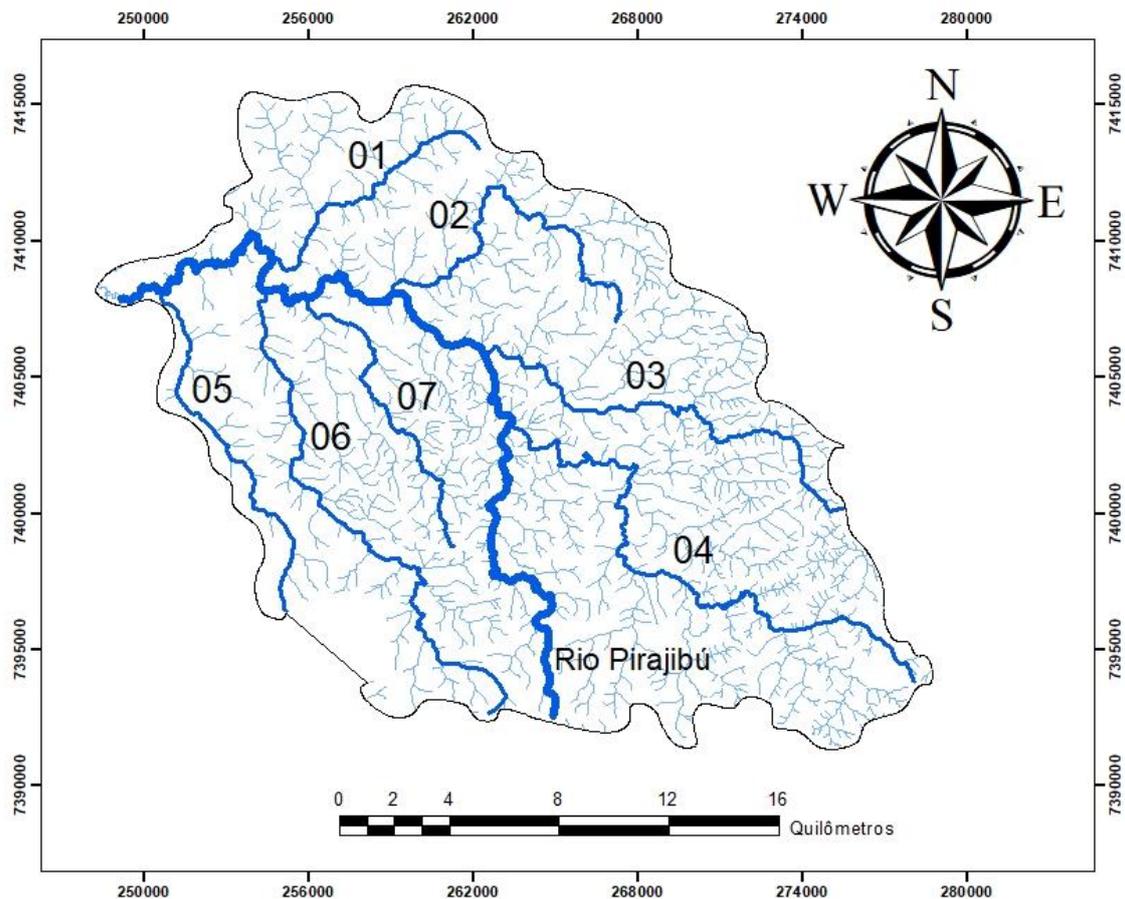
Figura 2: Bacia Hidrográfica do rio Pirajibú.



Base : DataGEO - Infraestrutura de dados espaciais ambientais do Estado de São Paulo.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 3: Bacia Hidrográfica do rio Pirajibú – Detalhe para a hidrografia.



Legenda:

01: Ribeirão Tapera Grande, 02: Ribeirão Varejão, 03: Ribeirão Mato Dentro, 04: Ribeirão do Varjão, 05: Rio Itaguaraçu, 06: Rio Pirajibú-mirim, 07: Córrego Aparecidinha.

Base: DataGEO - Infraestrutura de dados espaciais ambientais do Estado de São Paulo.

Datum SIRGAS 2000 - Projeção UTM - Fuso 23 S.

Fonte: Elaboração própria.

3.3.2. Hidromorfologia

A hidromorfologia abrange o estudo dos parâmetros e processos hidrológicos e morfológicos, que determinam as características e o comportamento da bacia hidrográfica, tais como tamanho, forma, padrão de escoamento e suscetibilidade a cheias (SALAMI *et al.*, 2016). Walm (1999), também descreveu os parâmetros hidromorfológicos relativos a bacia do rio Pirajibú.

- **Coefficiente de compacidade ou Índice de Gravelius:** Apresenta um valor adimensional de 1,29. Este coeficiente é interpretado a partir da parte inteira e decimal do número. No caso da bacia do Pirajibú, o número inteiro pequeno indica que a bacia é pouco alongada, e número decimal 0,29 demonstra que a bacia é pouco circular, relativamente irregular, e mediantemente ou pouco sujeita a cheias intensas.

- **Fator de forma:** Também é um parâmetro adimensional, e possui um valor de 0,23. O fator de forma é a relação entre a largura média e o comprimento do rio mais longo da bacia. Este fator é diretamente proporcional a suscetibilidade a cheias. O resultado obtido é considerado baixo, logo a bacia do Pirajibú é pouco sujeita a cheias.
- **Densidade de drenagem:** A densidade de drenagem na bacia do rio objeto deste estudo é de 1,28 km/km², o que é considerado um resultado médio, indicando que a bacia é relativamente bem drenada, com média a baixa possibilidade de cheias.
- **Extensão superficial média:** Representa a largura média da bacia, e apresenta um valor de 5 km, o que demonstra o caráter estreito da mesma.
- **Declividade média do leito:** A declividade média do rio Pirajibú é de 10 m/km, o que é considerado alto, e repercute em um escoamento rápido.
- **Sinuosidade:** Tal como o coeficiente de compactidade e o fator de forma, a sinuosidade também é um parâmetro adimensional, e para o rio Pirajibú apresenta um valor de 1,95, o que significa que o mesmo é pouco sinuoso e com baixa suscetibilidade a cheias.

As características hidrológicas de uma bacia são fortemente influenciadas pelo clima, e em especial a precipitação, cuja média anual na bacia do rio Pirajibú varia entre 1.000 e 1.700 mm (MANFREDINI, 2015).

Quanto ao clima, de acordo com a classificação proposta por Köppen-Geiger, a bacia do rio Pirajibú está inserida dentro da zona climática denominada Cfa – Clima subtropical úmido (MANFREDINI, 2015). Esta zona climática se caracteriza por possuir verões quentes e com altos índices pluviométricos, sendo que os invernos apresentam temperatura moderada e possuem menos chuvas, apesar da precipitação do mês mais seco normalmente ser superior a 40 mm (ALVARES *et al.*, 2013).

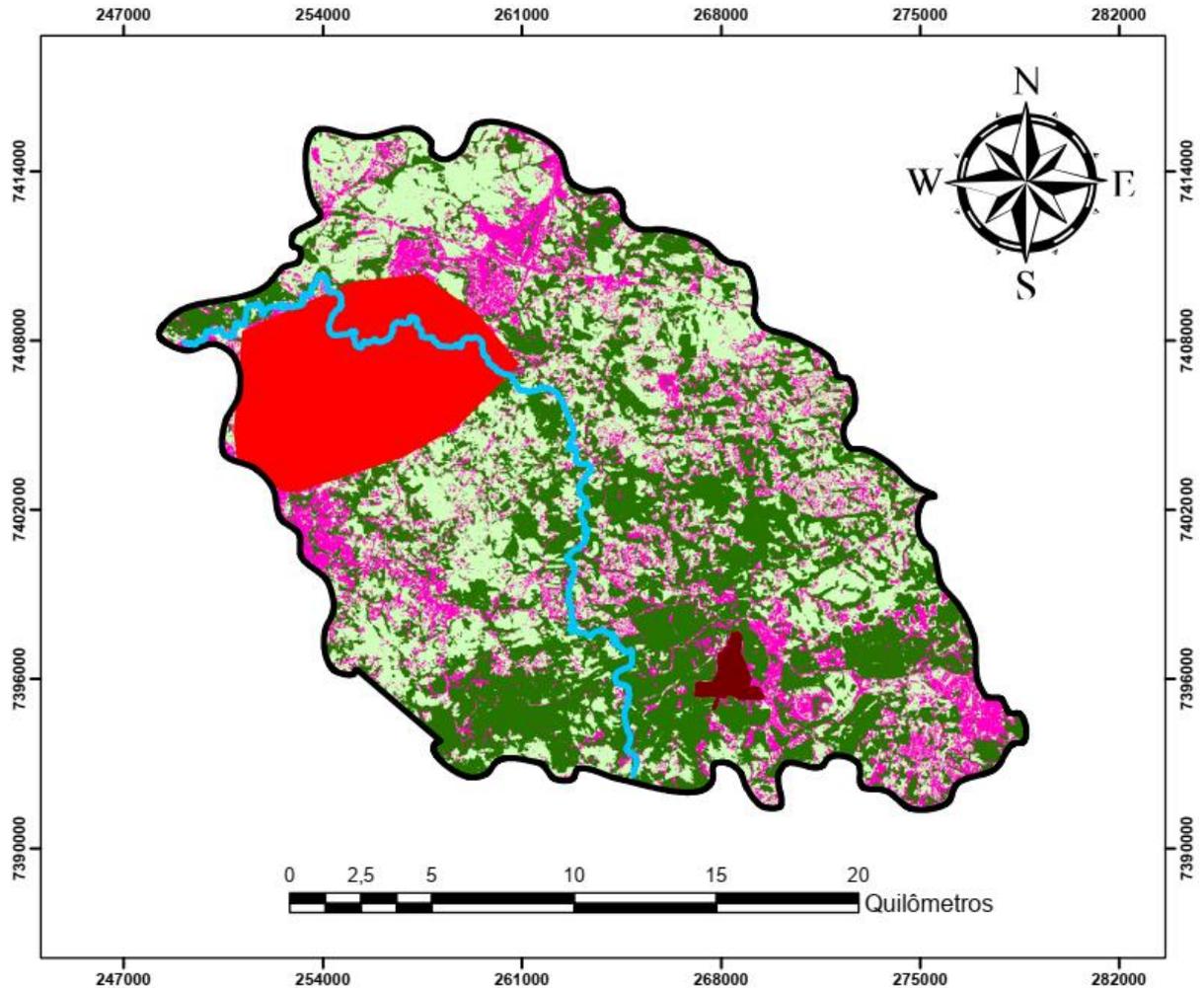
3.3.3. Vegetação e Uso e Ocupação do Solo

Para Corrêa, Tonello e Franco (2016), a vegetação na região do médio Sorocaba, onde está inserida a bacia do Rio Pirajibú, possui caráter ecótono, com características de cerrado e mata atlântica.

Atualmente a vegetação na região em questão é composta majoritariamente por remanescentes de vegetação secundária (BARBIERATO, 2014), a qual encontra-se amplamente degradada, com a presença principalmente de matas ciliares, que é observada sobretudo nas nascentes (CANABARRO; TOLEDO; BARRELLA, 2008).

Quanto ao uso e ocupação do solo na bacia do rio Pirajibú, além das áreas de mata, identifica-se a presença de áreas ocupadas por pastagem, agricultura, indústrias, residências e zona urbana em geral (BARBIERATO, 2014), como ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Uso e ocupação do solo na bacia hidrográfica do rio Pirajibú.



Legenda

	Zona industrial de Sorocaba		Empresa CBA em Alumínio/SP
	Fragmentos de vegetação nativa		Área Urbana / Residências
	Área antropizada (solo exposto, silvicultura, área de campos)		
	Bacia do rio Pirajibú		Rio Pirajibú

Bases : DataGEO - Infraestrutura de dados espaciais do Estado de São Paulo /
Software Google Earth Pró.

Datum: SIRGAS 2000 - Projeção UTM - Fuso 23 S

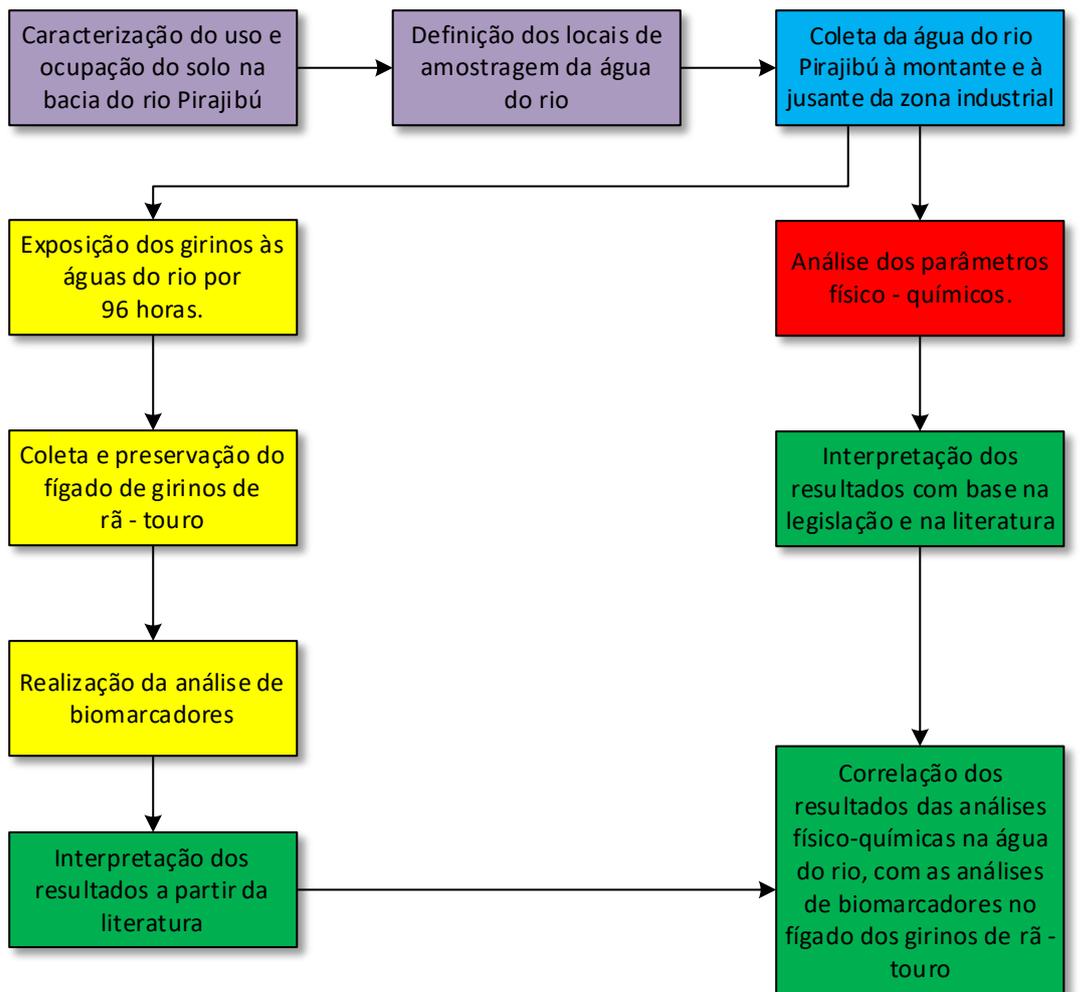
Fonte: Elaboração própria

4. METODOLOGIA

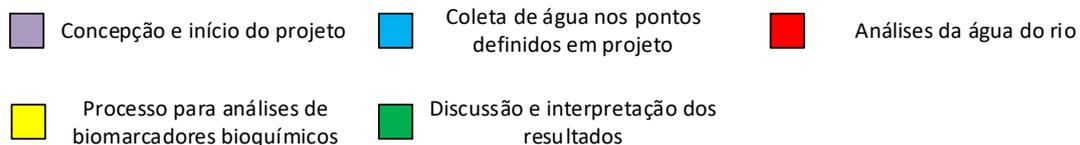
O desenvolvimento deste estudo se baseou em três etapas, sendo elas: (1) caracterização do uso e ocupação do solo na bacia do rio Pirajibú, (2) coleta das amostras de água no rio Pirajibú, nos pontos à montante e à jusante da zona industrial de Sorocaba para análise dos parâmetros físico-químicos, sendo que esta coleta ocorreu na manhã do dia 07/09/2020, (3) exposição dos girinos às águas obtidas do rio em questão, seguida da análise dos biomarcadores bioquímicos.

As etapas associadas a este estudo, são apresentadas detalhadamente no fluxograma experimental (figura 5).

Figura 5: Fluxograma da metodologia de estudo aplicada.



Legenda de cores



Fonte: Elaboração própria.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO USO E OCUPAÇÃO DO SOLO E DAS PROPRIEDADES DO MEIO FÍSICO NA BACIA DO RIO PIRAJIBÚ

A caracterização do uso e ocupação do solo, e das propriedades do meio físico na bacia hidrográfica do Pirajibú, foi efetuada no sentido de identificar os fatores naturais e antrópicos capazes de influenciar a qualidade da água deste rio.

O levantamento e apresentação destas informações, se deu com o auxílio de ferramentas SIG (Sistema de Informações Geográficas), dentre as quais estão os softwares Arcgis e Google Earth Pro, bem como a base de dados espaciais disponível na plataforma Datageo do Governo do Estado de São Paulo, que pode ser acessada no link <<https://datageo.ambiente.sp.gov.br/>>.

Complementarmente, a caracterização do uso e ocupação do solo também incluiu a identificação das empresas que descartam efluentes no rio Pirajibú, cujo levantamento ocorreu pela consulta ao banco de dados do Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE), que pode ser acessado pelo link <<http://www.aplicacoes.dae.sp.gov.br/usuarios/fchweb.htm>>.

4.2. COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA PARA ANÁLISE EM LABORATÓRIO

Os procedimentos e técnicas de amostragem, foram efetuados com base nas Normas Brasileiras (NBR) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) aplicáveis, que compreendem a ABNT NBR 9897:1987 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores, a ABNT NBR 9898: 1987 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores, e sobretudo o Guia nacional de coleta e preservação de amostras - Água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos, elaborado pela Agência Nacional de Águas (ANA), em conjunto com a CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2011).

Os parâmetros analisados, e suas prováveis origens são apresentadas na tabela 2.

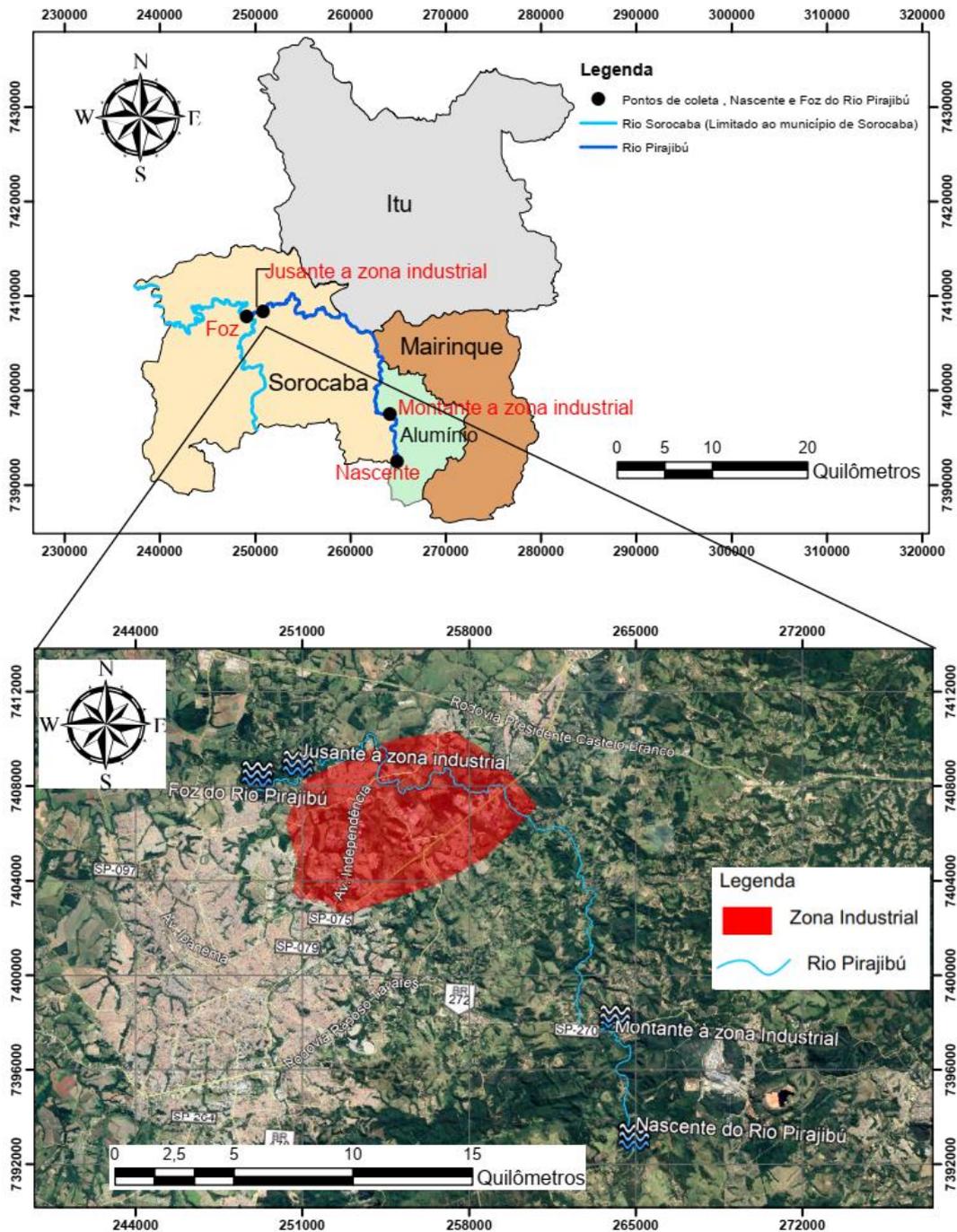
Tabela 2: Parâmetros de interesse para o rio Pirajibú.

Classe	Descrição dos parâmetros	Fontes de poluição de origem
Metais	Alumínio, Bário, Cádmio, Cobalto, Cromo, Cobre, Estrôncio, Manganês, Molibdênio, Níquel, Potássio e Zinco.	Indústrias que descartam efluentes no rio, sobretudo as metalúrgicas.
Outros parâmetros físico-químicos.	DQO, Nitrato, Nitrito, Íon amônio, Fósforo Total Dissolvido, e Fosfato.	Efluente sanitário das residências e indústrias.

Fonte: Elaboração própria.

As análises ocorreram nas amostras de água coletadas à montante e jusante da zona industrial, na água do ponto de controle (água de abastecimento declorada), e nas águas dos aquários de exposição dos girinos no final do experimento. A localização georreferenciada dos dois pontos onde a água do rio Pirajibú foi coletada consta na figura 6, e as coordenadas UTM destes pontos estão representadas na tabela 3.

Figura 6: Localização dos pontos de coleta das amostras de água no rio Pirajibú.



Bases : DataGEO - Infraestrutura de dados espaciais do Estado de São Paulo / Software Google Earth Pró.
Datum: SIRGAS 2000 - Projeção UTM - Fuso 23 S

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3: Coordenadas UTM dos pontos de coleta das amostras de água no rio Pirajibú.

Ponto	UTM Leste (m E)	UTM Norte (m N)	Datum / Fuso
Montante	264.151,24	7.397.547,41	SIRGAS 2000 / Fuso 23 S
Jusante	250.815,00	7.408.331,00	
Nascente	264.882,52	7.392.538,16	
Foz	249.089,79	7.407.878,85	

Fonte: Elaboração própria.

4.2.1. Procedimentos de Coleta, Preservação e Armazenamento das Amostras

A coleta de amostras de água do rio Pirajibú, baseou-se especificamente no anexo 1, e nos itens 3 e 6 do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - Água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos (ANA, CETESB; 2011). Além disso, também foram observados os itens 4.3 e 4.4 da ABNT NBR 9898: 1987 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. As metodologias analíticas descritas na tabela 4 também foram observadas, pois além de abranger as técnicas de análise, as mesmas dispõem sobre os procedimentos de preservação e armazenamento aplicados nas amostras.

Tabela 4: Métodos de referência para análise, preservação e armazenamento das amostras.

Parâmetro	Métodos de referência
Metais	U.S. EPA. 2007. “Método 3015A” – Água.
DQO	APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21ª Edição.
NO ₂ ⁻ – Nitrito	APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21ª Edição. Colorimétrico - Método 4500NO ₂ B.
NO ₃ ⁻ – Nitrato	APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21ª Edição. Espectrofotométrico Ultravioleta - Método 4500NO ₃ B.
NH ₄ ⁺ – Íon Amônio	Koroleff, F. (1976). Determination of nutrients: 2. Ammonia, in: Grasshoff, K. (Ed.) Methods of seawater analysis. pp. 126-133
PO ₄ – Fosfato	APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21ª Edição. Método 4500P E – Ácido ascórbico.
PTD – Fósforo Total Dissolvido	APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21ª Edição. Método 4500P B - Digestão com persulfato + Espectrofotométrico - Método 4500P E – Ácido ascórbico.

Fonte: Elaboração própria.

Na ocasião das coletas de água do rio Pirajibú, que ocorreu em setembro/2020, foram adotados os procedimentos:

- Ambientação do recipiente de coleta (balde) com a água do rio.
- Posicionamento ou lançamento do recipiente de coleta no ponto mais ao centro possível do leito rio, a uma profundidade de aproximadamente de 0,30 m.
- Leitura e anotação do pH e temperatura da amostra da água do rio.
- Preenchimento do galão de 50 L com a amostra de água obtida no recipiente de coleta (balde), destacando que antes de ser preenchido, o galão de 50 L foi devidamente ambientado com a água do rio. Uma vez completado até aproximadamente 80% da sua capacidade, o galão com as amostras da água do rio foi encaminhado para o laboratório, onde uma parcela da água foi destinada para análise dos parâmetros físico-químicos, enquanto a outra foi inserida nos aquários para a exposição dos girinos de rã-touro.
- Para a análise de metais, que foi efetuada pela Professora Doutora Luciana Camargo de Oliveira da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Campus Sorocaba, 500 mL da água do rio Pirajibú presentes no galão foram transferidos para um Béquer de mesmo volume, onde foi acidificado com ácido nítrico (HNO_3) até que se alcançasse o $\text{pH} < 2$. Neste processo de acidificação foi utilizado o HNO_3 65% diluído 1:3, (v/v). Feita a acidificação, as amostras foram mantidas resfriadas a $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.
- O parâmetro DQO, analisado no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da UFSCar – Campus Sorocaba, e os parâmetros Nitrato, Nitrito, Íon Amônia, Sulfato e Fósforo, analisados no Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE) da Universidade de São Paulo (USP) – Campus São Carlos, também foram analisados em duplicata, e não exigiram a adição de preservantes, sendo que as amostras permaneceram congeladas a $-22\text{ }^\circ\text{C}$ até que fosse possível efetuar as análises, respeitando-se contudo o período máximo de 6 meses.

4.3. EXPOSIÇÃO DOS GIRINOS DE RÃ TOURO ÀS ÁGUAS DO RIO PIRAJIBÚ, SEGUIDA DA ANÁLISE DOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES ÓRGÃOS

Este estudo possui a aprovação Comitê do Conselho de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com protocolo número 2775051219/2019.

Os girinos de rã touro foram expostos às águas do rio Pirajibú coletadas à montante e jusante da zona industrial, e a identificação de eventuais efeitos adversos no fígado destes organismos se deu através dos seguintes biomarcadores:

- Determinação dos níveis da GSH, com os resultados expressos em μM GSH/mg de proteína.
- Determinação da atividade da enzima antioxidante GPx, com resultado expresso em nanomoles de NADPH oxidado/min/mg de proteína, e da enzima de biotransformação GST, cujo resultado foi expresso em nanomoles tioéter formado/min/mg de proteína.
- Análise dos metabólitos proteínas, glicose e triglicerídeos, todos com resultados expressos em mg/mL.

4.3.1. Protocolos Experimentais

Os girinos de rã-touro utilizados nos experimentos, foram obtidos em um ranário localizado em Santa Bárbara d'Oeste/SP no dia 29/08/2020. No ato da aquisição dos girinos, foi verificado o pH (7,4) e temperatura da água (23,2°C).

No laboratório, os girinos foram aclimatados por 9 dias, e permaneceram em um aquário com água que abastece a universidade previamente declorada.

Para a realização dos experimentos, os animais foram divididos em 3 grupos:

- Grupo controle (CTR): Correspondeu ao grupo exposto a água isenta de contaminantes (água que abastece a universidade declorada).
- Grupo montante: Organismos expostos à água coletada a Montante à zona industrial.
- Grupo jusante: Organismos expostos à água coletada no ponto a Jusante à zona industrial.

Cada grupo possuía 15 animais, os quais foram expostos durante 96 horas em sistema estático. Os grupos experimentais foram ensaiados em duplicata. Os aquários usados durante os ensaios possuíam capacidade para 16 L, e foram mantidos em temperatura controlada (25 ± 1 °C) e aeração constante ($> 6,0$ mg O₂/L).

Durante os experimentos de exposição, o comportamento dos animais foi observado regularmente. Todos os procedimentos atenderam as normas estabelecidas pela American Society for Testing and Materials - ASTM (2000).

No final do experimento os órgãos dos animais foram retirados após anestesia com benzocaina 0,01% e secção da medula de acordo com a recomendação da American Veterinary Medical Association (AVMA, 2001), e imediatamente congelados a -80 °C para as análises bioquímicas.

Finalizada a coleta dos órgãos dos girinos, foram coletadas amostras de água de todos os aquários para análises físico-químicas.

4.3.2. Ensaio Enzimáticos e Não Enzimáticos

As amostras de tecido foram homogeneizadas individualmente com um homogeneizador de tecidos Potter-Elvehjem Teflon em três volumes de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) contendo ditioneitol (DTT) 1 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM a 4 °C. Todas as análises bioquímicas foram realizadas em leitor de microplacas – espectrofluorímetro Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g (HERMLE Z 323 K) durante 30 min a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para determinação de proteínas totais (BRADFORD, 1976), utilizando-se como padrão proteico albumina sérica bovina a 595 nm.

A determinação da GSH se deu de acordo com a metodologia descrita por Beutler (1963) usando o reagente de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzóico - DTNB). Os homogeneizados de tecido foram tratados com ácido tricloroacético (TCA) 12%, centrifugados e os sobrenadantes utilizados para análise do conteúdo de GSH adaptado de Wilhelm-Filho (2005). A GSH reage com DTNB produzindo o composto ácido 5-tio-2-nitrobenzóico de cor amarelada, que é lido a 412 nm. O coeficiente de extinção molar do DTNB de 13,6 mM cm⁻¹ foi utilizado para calcular a concentração de GSH e expressa em nanomol/proteína.

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Flohé e Günzler (1984). A atividade da GPx foi determinada pela diminuição da absorvância (oxidação) da β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) catalisada pela glutathione redutase (GR) por redução da glutathione oxidada (GSSG) a 340 nm. A atividade da enzima é expressa como μmole de NADPH utilizado por minuto por mg de proteína, usando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 μmol⁻¹cm.

A atividade da GST, por sua vez, foi determinada de acordo com o método descrito por Keen *et al.* (1976) usando 1,5 mM de GSH como substrato. A atividade da GST foi determinada pelo aumento da absorvância devido à conjugação da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 2 mM (CDNB), formando um tioéter que pode ser monitorado a 340 nm. A atividade da enzima é expressa em nanomoles tioéter formado /minuto / mg de proteína.

Quanto as análises dos metabólitos, além das proteínas totais cuja metodologia analítica já foi apresentada, a concentração de glicose foi determinada através do Kit Labtest, Liquiform nº 133. A metodologia se baseia na oxidação da glicose, presente na amostra, pela glicose oxidase (GOD), em ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , na presença da 4-aminoantipirina e fenol, catalisados pela peroxidase (POD) leva a formação de antipirilquinonimina, um composto rosa avermelhado. A intensidade da coloração é diretamente proporcional a quantidade de glicose na amostra analisada. A concentração de glicose foi determinada de acordo com uma curva padrão de glicose e expressa como mg/dL.

O triglicerídeo também foi avaliado, e sua análise se deu com a utilização do Kit Labtest Liquiform nº 87. A reação se baseia na ação da lipase, que promove a hidrólise dos triglicerídeos, liberando glicerol e ácidos graxos, contidos na amostra. O glicerol, por ação da glicerolquinase, é convertido em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e H_2O_2 na presença da glicerol-3-fosfato oxidase. Posteriormente, ocorre uma reação de acoplamento entre o H_2O_2 , 4-aminoantipirina e 4-clorofenol catalisada pela peroxidase (POD), produzindo uma quinoneimina que tem máxima absorvância em 505 nm. A concentração de triglicerídeos foi expressa como mg/dL, e sua determinação ocorreu a partir da equação obtida pela curva padrão.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concentração dos metais na água e dos biomarcadores foi expressa como média \pm desvio padrão (D.P). Os valores médios obtidos de cada parâmetro (parâmetros físico-químicos e biomarcadores bioquímicos) em cada tratamento (controle, montante e jusante), foram comparados entre o controle e os pontos, utilizando o teste t ou Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância). Todos os testes foram realizados usando SigmaStat 3.5 para Windows (Copyright © 2006, Systat Software, Inc.). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DADOS DO RIO PIRAJIBÚ DISPONÍVEIS NOS ÓRGÃOS AMBIENTAIS DE FISCALIZAÇÃO E CONTROLE

Ao longo de seu percurso, o rio Pirajibú recebe o lançamento de efluentes provenientes de diversas empresas situadas na zona industrial de Sorocaba. A relação dessas empresas consta na tabela 5, e esses dados foram obtidos do “Relatório de Recursos Hídricos cadastrados e outorgados pelo DAEE” (Departamento de Águas e Energia Elétrica). O referido relatório está na página do DAEE, que é o órgão responsável pela gestão dos recursos hídricos no Estado de São Paulo, e pode ser acessado pelo link:

<<http://www.aplicacoes.daee.sp.gov.br/usuarios/fchweb.html>>.

Tabela 5: Empresas que descartam efluentes no rio Pirajibú.

Nome do empreendimento	Ramo de atividade	Vazão	Coordenadas UTM DATUM: SIRGAS 2000 Zona: 23S	
			UTM Norte (KM N)	UTM Leste (KM E)
Iharabras SA Indústrias Químicas	Fabricação de defensivos agrícolas	37 m ³ /hora	7.407,59	255,91
		37 m ³ /hora	7.407,92	256,08
		37 m ³ /hora	7.408,06	256,39
		37 m ³ /hora	7.408,22	256,41
		1 m ³ /hora (maio a setembro) e 4 m ³ /hora (Outubro a abril)	7.408,07	257,70
Metso Brasil Indústria e Comércio Ltda	Fundição de ferro e aço	2,87 m ³ /hora	7.408,00	249,83
Sr. Ismael Gonçalves Cardoso	Produção de biodiesel	15 m ³ /hora	7.407,76	258,23
Pepsico do Brasil / Serviço Autônomo de Água e Esgoto - SAAE - Valo de oxidação do Éden.	Alimentício / Consórcio de empresas que descartam efluentes sanitários	130,70 m ³ /hora	7.408,36	254,14
Textil Dalutex	Fabricação de outros produtos têxteis não especificados anteriormente	48 m ³ /hora	7.408,23	254,34

Fonte: Elaborado a partir de DAEE (2022).

Continuação da tabela 5: Empresas que descartam efluentes no rio Pirajibú.

Nome do empreendimento	Ramo de atividade	Vazão	Coordenadas UTM DATUM: SIRGAS 2000 Zona : 23 S	
			UTM Norte (KM N)	UTM Leste (KM E)
W. R. Grace Brasil Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda	Fabricação de outros produtos químicos não especificados anteriormente	650 m ³ /dia	7.408,01	258,92
Aurora Terminais e Serviços Ltda (Porto Seco de Sorocaba)	Depósitos de mercadorias para terceiros, exceto armazéns gerais e guarda-móveis	94,80 m ³ /dia e vazão máxima instantânea é de 3,95 m ³ /hora	7.408,02	259,19
Roberta Serviços e Investimentos Ltda Obs: O lançamento não está mais ocorrendo. Foi fornecida uma autorização do DAEE em 2016, e não foi renovada	Atendimento sanitário, no Sítio Maria Paulo - gleba B1, Rodovia José Ermiro de Moraes, km 11, Bairro do Varjão, no município de Sorocaba	4 m ³ /hora	7.407,62	259,51
ZF do Brasil Ltda	Fabricação de peças e acessórios para os sistemas de marcha e transmissão de veículos automotores	27,80 m ³ /hora	7.407,64	255,26
Prysmian Cabos E Sistemas do Brasil S/A	Fabricação de fios, cabos e condutores elétricos isolados	2,12 m ³ /hora	7.408,66	252,03
Furukawa Industrial S. A. Produtos Elétricos	Fabricação de fios, cabos e condutores elétricos isolados	2,5 m ³ /hora	7.408,50	252,15
Flextronics International Tecnologia Ltda	Fabricação de periféricos para equipamentos de informática	11 m ³ /hora	7.407,87	258,21

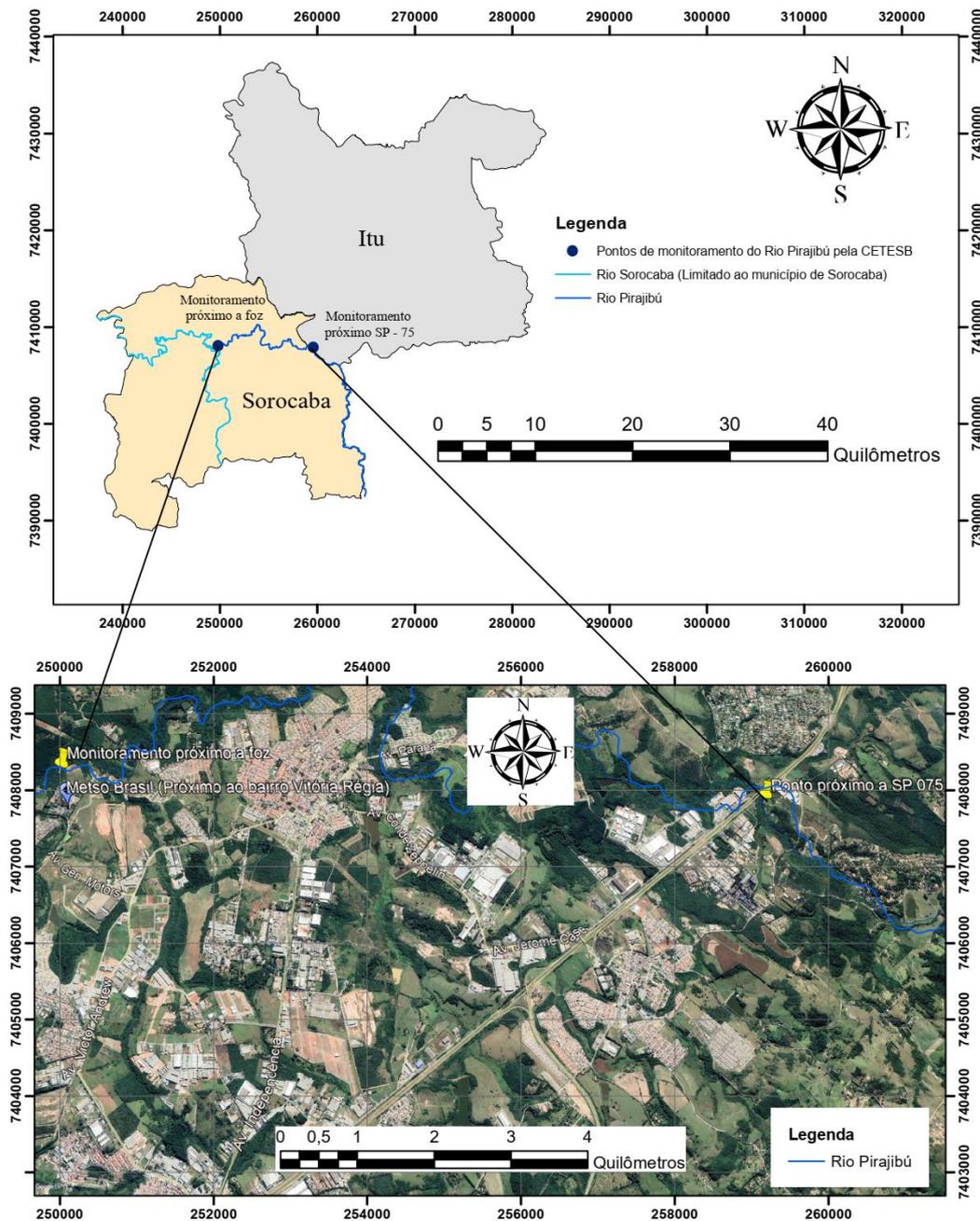
Fonte: Elaborado a partir de DAEE (2022).

Quanto a avaliação da qualidade das águas do rio Pirajibú, a CETESB promove o monitoramento deste rio em dois pontos, sendo um deles próximo a sua foz, nas adjacências do bairro Vitória Régia em Sorocaba (após a zona industrial), e outro ponto situado na ponte da

rodovia SP - 075 (Rodovia Senador José Ermírio de Moraes), na divisa entre os municípios de Sorocaba e Itu, que está inserido na zona industrial de Sorocaba (CETESB, 2022). Os resultados deste monitoramento são públicos, e estão disponibilizados no sistema Infoáguas, que pode ser acessado no site da CETESB, através do link <<https://cetesb.sp.gov.br/infoaguas/>>.

A localização destes pontos de monitoramento pela CETESB está indicada na figura 7, e as coordenadas UTM constam na tabela 6.

Figura 7: Localização dos pontos de monitoramento do rio Pirajibú pela CETESB.



Bases : DataGEO - Infraestrutura de dados espaciais do Estado de São Paulo / Software Google Earth Pró.
Datum: SIRGAS 2000 - Projeção UTM - Fuso 23 S

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6: Coordenadas UTM dos pontos de monitoramento do rio Pirajibú pela CETESB.

Ponto	UTM Leste (m E)	UTM Norte (m N)
Ponto próximo a ponte da SP 075	259.591	7.407.899
Ponto próximo a foz	249.840	7.408.050

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados do monitoramento promovido pela CETESB nos dois pontos do rio Pirajibú, estão presentes no apêndice A. Este monitoramento compreende vários parâmetros, de modo que no referido apêndice, são apresentados apenas os parâmetros que possuem referência legal ou técnica, que abrangem a Resolução Conama nº 357/2005, o Decreto Estadual nº 8468/1976, e o índice de qualidade das águas, presente no Apêndice D do Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo, publicado pela CETESB em 2018.

Quanto ao período de monitoramento, as análises das amostras obtidas junto a ponte da SP - 075, começaram a ser realizadas em janeiro de 2018, e ocorreram ao longo de todo este ano, sendo que os resultados relativos entre 2019 a 2021 não constam no sistema Infoáguas, o que indica que o monitoramento não foi realizado, ou que os dados ainda não foram divulgados. Já o monitoramento próximo a foz do rio, nas imediações do bairro Vitória Régia em Sorocaba, iniciaram-se no ano de 2005. No entanto, no apêndice A são apresentados apenas os resultados dos últimos cinco anos com dados disponíveis, os quais são relativos aos anos 2015 a 2019, pois os anos 2020 e 2021 não possuem dados até o momento, o que também indica que o monitoramento neste ponto não foi realizado nestes dois últimos anos, ou que os dados ainda não foram processados e disponibilizados para o público.

Alguns dados e resultados relevantes podem ser destacados a partir do monitoramento efetuado pela CETESB no rio Pirajibú:

- Em ambos os pontos de monitoramento, os parâmetros DBO, fósforo e oxigênio dissolvido (O.D), não atenderam os valores estabelecidos pelas legislações vigentes durante alguns meses entre os anos de 2015 a 2019, indicando que a quantidade de material orgânico lançado no rio, está afetando a qualidade do mesmo em alguns períodos.

- Parâmetros inorgânicos como o fluoreto, e os metais alumínio, ferro e manganês, não atenderam a legislação em alguns meses entre os anos de 2015 e 2019, nos dois pontos do monitoramento.
- Os Ensaio Microtox®, que são um indicativo de toxicidade aguda em amostras de água através da exposição da bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (CETESB, 2001), sinalizam que as águas do rio nos dois pontos de monitoramento, não são capazes de provocar efeitos agudos aos organismos aquáticos.

5.2. ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS EFETUADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A coleta das amostras de água foi realizada no dia 07 de setembro de 2020, que corresponde ao período de estiagem, sendo que o dia estava ensolarado nos pontos à montante, e à jusante rio Pirajibú, e a última chuva registrada havia ocorrido há mais de 15 dias. Nesta ocasião, não foi observada a presença odores, materiais flutuantes ou em suspensão em ambos os pontos de amostragem. Além disso, constatou-se que o rio Pirajibú possuía baixa turbidez, com aspecto predominantemente límpido, sobretudo à montante da zona industrial.

As análises físico-químicas realizadas, indicaram que as amostras coletadas à jusante da zona industrial, possuíam qualidade inferior em relação as amostras obtidas à montante desta região (tabela 7).

Tabela 7: Análises físico-químicas das águas do rio Pirajibú antes e após o período de exposição por 96 horas dos girinos.

Variáveis	Legislações de Referência		Controle		Montante		Jusante	
	CONAMA 357/2005 Águas classe II	Decreto 8468/1976 Águas classe II	Antes da exposição dos girinos	Após a exposição dos girinos	Antes da exposição dos girinos	Após a exposição dos girinos	Antes da exposição dos girinos	Após a exposição dos girinos
pH	6,00 –9,00	--	7,20	8,20	7,00	7,50	7,50	7,90
DQO (mgO ₂ /L)	--	--	<LQ	56,75± 2,12↑	<LQ	42,26± 1,02↑	<LQ	87,88± 2,02#↑
NO ₂ (µg/L)	1.000,00	1.000,00	2,53±0,05	3,25±0,11↑	<LD	1,75±0,22↑	207,22±16,00#	327,75±34,32↑
NO ₃ (mg/L)	10,00	10,00	0,38± 0,08	0,30±0	0,11±0,01	0,19±0,03	1,38±0,31#	1,43±0,27#
NH ₄ (mg/L)	--	0,50	0,05±0	2,38± 0,17↑*	0,03±0	3,07± 0,30↑*	3,48± 0,28#*	2,93± 0,09#↓*
PO ₄ (mg/L)	--	--	0,09±0,03	0,47±0,03↑	0,38± 0	0,49±0,09↑	1,00±0,22#	1,03±0,14#
PTD (µg/L)	--	--	0,34± 0,03	1,56±0,09↑	0,19±0	1,35±0,23↑	1,89±0,33	2,85±0,20#↑
Al (µg/L)	100,00	--	<L.D	<L.D	<L.D	LD	8,00 ± 7,00	4,00±1,00
Ba (µg/L)	700,00	1.000,00	16,00± 1,00	16,00± 1,00	14,00± 1,00	9,00 ± 1,00	38,30± 2,00#	15,00± 1,00
Cd (µg/L)	1,00	10,00	1,00± 2,00	1,00 ± 1,00	4,00±1,00*	1,00± 1,00	9,00 ± 2,00#*	1,00± 1,00↓
Co (µg/L)	50,00	-	<L.D	LD	<L.D	LD	<L.D	<LD
Cr (µg/L)	50,00	50,00	2,00± 1,00	1,00± 1,00	1,00± 3,00	1,00± 3,00	4,00± 1,00#	1,00± 1,00↓
Cu (µg/L)	9,0	1.000,00	1,00± 1,00	2,00± 1,00↑	<L.D	1,00± 1,00	2,00± 1,00#	1,00± 1,00
K (µg/L)	--	--	2.266,00 ±143,00	3.894,00 ± 179,00↑	1520,00±101,00	2.130,00± 64,00	8.988,00±404,00#	5.714,00± 337,00
Mn (µg/L)	100,00	--	2,00 ± 1,00	25,00 ± 1,00↑	23,00 ± 3,00	33,00 ± 3,00	490,00 ± 40,00#*	194,00 ± 19,00*
Mo (µg/L)	--	--	<L.D	<L.D	<L.D	LD	<L.D	LD
Ni (µg/L)	25,00	--	<L.D	LD	<L.D	<L.D	<L.D	LD
Sr (µg/L)	--	--	262,00 ± 8,00	260,00 ± 6,0	20,00 ± 1,00	40,00 ± 2,00↑	82,00 ± 3,00#	60,00± 2,00#
Zn (µg/L)	180,00	5.000,00	8,00 ± 1,20	34,00 ± 6,0	<L.D	1,0± 0	<L.D	<LD

Em negrito indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo período; # indica diferença significativa em relação aos pontos Montante e Jusante; <LD = abaixo do limite de detecção; ND = não determinado; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição; * parâmetro que superou o valor máximo permitido pelas legislações ambientais (Resolução CONAMA 357/2005 e Decreto 8468/1976 do Estado de São Paulo).

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados indicados na tabela 7, demonstraram que o período de exposição de 96 horas repercutiu em uma elevação do pH nos aquários, que passou de 7,2 para 8,2 nas águas do controle, de 7,0 para 7,5 nas amostras associadas a montante, e de 7,5 para 7,9 na jusante. Apesar desta constatação, Von Sperling (1996) descreveu que maiores concentrações de nutrientes e matéria orgânica, que tendem a ocorrer nas águas dos aquários após a exposição dos animais, normalmente provocam a diminuição do pH. Assim sendo, a elevação do pH da água após a exposição dos girinos, não pode ser explicada a partir dos parâmetros físico-químicos analisados neste estudo. Complementarmente, a concentração elevada do íon amônio (NH_4^+), pode estar associada ao pH relativamente baixo nas amostras, uma vez que valores de pH menores que 8,5 favorecem a formação de NH_4^+ e inibem a formação de NH_3 , que é a amônia na forma não ionizada, e cuja toxicidade é muito superior ao íon amônio (PEREIRA; MERCANTE, 2005; WEN *et al.*, 2019).

Quanto a DQO, as concentrações nas águas coletadas do rio foram muito baixas, sem variações significativas entre os três grupos, visto que todos apresentaram resultados abaixo do Limite de Quantificação do Método (L.Q), que é de 25 mgO_2/L ou 25.000 $\mu\text{gO}_2/\text{L}$. Para as amostras coletadas após a exposição dos girinos, observou-se que a DQO nos aquários do grupo jusante, foi 108% maior em relação ao grupo montante, e 54,85 % maior comparado ao controle. A exposição dos girinos resultou em um aumento significativo da DQO, de modo que antes da exposição, as águas em todos os grupos apresentaram concentrações menores que o limite de quantificação (L.Q), e após este período, a DQO foi de $56.750,00 \pm 2.124,00 \mu\text{g O}_2/\text{L}$ no grupo controle, $42.250,00 \pm 1.023,00 \mu\text{g O}_2/\text{L}$ no grupo montante, e $87.880,00 \pm 2.025,00 \mu\text{g O}_2/\text{L}$ no grupo jusante, sendo que este aumento na DQO pode ser explicado pelos resíduos de alimentos fornecidos aos girinos de rã-touro, e pelas suas excretas.

Embora a DQO tenha sido quantificada apenas nas amostras coletadas após o período de exposição dos girinos, a concentração mais elevada da DQO nas águas do grupo jusante, sugere a influência negativa das indústrias, e também pode ser explicada pelo estudo desenvolvido por Duan *et al.* (2016), os quais apontam que os altos valores deste parâmetro refletem a poluição orgânica proveniente dos efluentes industriais e domésticos.

Em relação aos compostos de fósforo e nitrogênio, todos os parâmetros apresentaram concentrações mais elevadas nas amostras associadas a jusante. A exposição dos girinos, também resultou no aumento da concentração para a maioria dos compostos de fósforo e nitrogênio analisados, o qual pode ser explicado pelas excretas e restos de alimentos presentes na água onde os animais foram expostos. Após o período de exposição dos girinos, ocorreu um

aumento significativo para o NO_2 (aumento de 30% no grupo controle e de 58,18% no grupo jusante, destacando que para o grupo montante a porcentagem do aumento não pode ser mensurada pois o NO_2 não foi detectado na água analisada antes da exposição dos animais), para o PO_4 (aumento de 487,5 % no grupo controle, 1500 % no grupo montante, e 2% no grupo jusante), e para o fósforo total dissolvido (PTD), que possuiu um aumento de 372,72 % no grupo controle, 605,26 % no grupo montante, e de 50,79 % no grupo jusante).

O fato das maiores concentrações dos compostos de fósforo e nitrogênio serem observadas nas amostras associadas a jusante da zona industrial, também corrobora para a poluição proveniente das indústrias que descartam efluentes no rio avaliado neste estudo. Liu *et al.* (2018), relacionaram as altas concentrações dos compostos de fósforo e nitrogênio com a lixiviação dos fertilizantes em áreas agrícolas, e com o lançamento de efluentes em corpos d'água. De forma específica ao rio Pirajibú, os efluentes industriais e domésticos são as principais fontes de nitrogênio e fósforo, visto que a atividade agrícola não predomina ao longo do leito deste rio.

Para as análises de metais, as maiores concentrações também foram identificadas majoritariamente nas amostras associadas a jusante a zona industrial, o que reforça a influência negativa das indústrias na qualidade da água do rio. Como exemplo, destaca-se o cromo com concentração de $1,00 \pm 3,00 \mu\text{g/L}$ nas águas da montante, e $4,0 \pm 1,00 \mu\text{g/L}$ na jusante, e o manganês, que apresentou concentração de $23,00 \pm 3,00 \mu\text{g/L}$ na montante, e $490,00 \pm 40,00 \mu\text{g/L}$ na jusante.

França *et al.* (2019) monitoraram os rios Sorocaba e Pirajibú durante as 4 estações entre março/2016 a fevereiro/2017, e também constataram que as maiores concentrações de metais ocorreram na região industrial de Sorocaba. Estes autores propuseram que estes resultados têm correlação com as empresas metalúrgicas e de galvanoplastia existentes na região.

Em relação às variações decorrentes da exposição dos girinos, o comportamento dos metais se alterou para apenas algumas amostras e parâmetros (tabela 7). A alteração significativa foi observada entre o período inicial e final de exposição para o cádmio (Cd) no grupo jusante, cuja concentração diminuiu 87,02 %, (Cr) no grupo jusante, com uma redução de 77,50 %, o cobre (Cu) no grupo controle, onde a concentração aumentou 81,03 %, o potássio (K) no grupo controle, com a concentração aumentando em 72,12%, o manganês (Mn) no grupo controle, que teve um aumento na concentração de 1125% entre o período inicial e final de exposição, e por fim o estrôncio (Sr) no grupo montante, onde a concentração aumentou em 100%.

A redução da concentração de metais após exposição dos girinos, que foi observada para os metais cádmio (grupo jusante) e cromo (grupo jusante), sugere que estes metais podem ter sido absorvidos pelos organismos, assim como o aumento da concentração, constatado no cobre (grupo controle), potássio (grupo controle), manganês (grupo controle) e estrôncio (grupo montante), é um indicativo que os organismos destes grupos podem ter liberado estes metais durante o período de exposição. Apesar das variações pontuais supracitadas, a alteração na concentração de metais não foi regular entre os parâmetros e grupos analisados, o que impossibilitou estabelecer uma relação entre o comportamento de metais e a exposição dos girinos. Fernandes *et al.* (2021), observaram a variação da concentração de metais após o período de exposição dos girinos, sendo que majoritariamente, foi constatado o aumento deste grupo de parâmetros. A diminuição na concentração dos metais, apesar de menos frequente, também foi observada, sendo que essa redução ocorreu apenas no período do inverno, e somente para o alumínio, manganês e zinco.

Ainda em relação a influência da zona industrial sobre as águas do rio Pirajibú, a mesma também é corroborada pelo monitoramento efetuado pela CETESB em dois pontos deste curso d'água, cujos resultados estão expressos no apêndice A, e demonstram que os parâmetros DBO, fósforo, oxigênio dissolvido (O.D), além dos metais alumínio, ferro e manganês, ultrapassaram os limites legais em algumas ocasiões. Vale ressaltar que dos pontos monitorados pela CETESB, um está inserido na zona industrial, e outro está situado geograficamente após a esta.

Apesar da evidente influência da zona industrial na qualidade da água do rio Pirajibú, apenas o cádmio, manganês e a amônia superaram o valor máximo permitido por lei (VMP) neste presente estudo. O cádmio superou o VMP nas amostras de água da montante, e jusante coletadas antes da exposição dos girinos. O manganês, por sua vez, superou o valor máximo legal apenas nas duas amostras associadas a jusante, isto é, que foram coletadas antes e após a exposição dos girinos. Para a amônia, o VMP foi ultrapassado nas águas do controle e da montante obtida após a exposição dos animais, bem como nas amostras da jusante, coletadas antes e após a exposição dos girinos, ou seja, no grupo jusante, a concentração de amônia já estava elevada na água obtida do rio antes da exposição dos animais.

Neste sentido, os resultados das análises físico – químicas demonstram que com exceção da amônia, cádmio e manganês, os parâmetros analisados atenderam os valores máximos permitidos por lei, o que atesta a hipótese de que a poluição no rio Pirajibú não é expressiva, visto que maior parte dos parâmetros atenderam os padrões estabelecidos pela legislação

ambiental, inclusive no ponto à jusante da zona industrial, cuja qualidade é evidentemente inferior à montante.

5.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) sobreviveram as 96 horas de exposição em todas as condições propostas. Durante o período de exposição, não foram observadas alterações comportamentais e no regime de alimentação dos girinos, também não se constatou a ocorrência de nado anormal, diferente do padrão serpentino descrito por Amaral *et al.* (2018).

5.3.1. Glutathione Peroxidase (GPx)

Os resultados das análises da enzima Glutathione peroxidase (GPx) no grupo controle, foi de $14,11 \pm 4,88$ nanomoles de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína, enquanto que nos grupos montante e jusante, a atividade da enzima GPx foi de respectivamente $6,94 \pm 0,99$ nanomoles de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína, e $9,92 \pm 3,27$ nanomoles de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína (figura 8).

A análise estatística destes resultados, indicou que somente foi considerada significativa a variação entre os grupos controle e montante, sendo observada uma menor atividade da enzima GPx neste último grupo.

Como já destacado, a glutathione peroxidase (GPx) pertence a fase II do processo de biotransformação, e está entre as enzimas que protegem as células do estresse oxidativo provocado pelas ERO-s (STRYDOM *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2017). Além disso, a GPx utiliza a GSH e decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio, bem como transforma os peróxidos lipídicos em seus correspondentes álcoois, que são compostos menos danosos aos organismos (BO *et al.*, 2018; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A atividade da GPx pode ser inibida ou diminuída pela exposição a agentes xenobióticos. Bo *et al.* (2018) constataram que a exposição ao fluoreto reduziu a atividade da GPx no fígado de anfíbios da espécie *Bufo gargarizans*, e Zhou *et al.* (2015) identificaram que este mesmo xenobiótico provocou a diminuição da atividade da GPx no fígado de uma espécie de ratos chinesa. Nestes dois estudos, os menores níveis de GPx podem desencadear o aumento das ERO-s, resultando em danos nos componentes celulares, e em alterações na sua estrutura e função. Não obstante, a diminuição ou inibição da atividade da enzima GPx, pode estar associada ao fato dos radicais gerados pela exposição aos xenobióticos, serem combatidos por outras defesas antioxidantes enzimáticas, como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), que são consideradas como a primeira linha de defesa no organismo contra a toxicidade

do oxigênio, e geralmente são usadas como biomarcadores que indicam a produção de ERO-s (VAN DER OOST *et al.*, 2003; SK; BHATTACHARYA, 2006).

Como já sinalizado, neste presente estudo, a atividade da GPx foi menor no grupo montante em relação ao controle, enquanto que no grupo jusante não foi verificada nenhuma variação em relação ao controle. Considerando que a água coletada no ponto à jusante da zona industrial apresentou maior concentração de contaminantes, a ausência de variação da enzima GPx não é suficiente para descartar a existência de estresse oxidativo nos organismos do grupo jusante, uma vez que as ações de enzimas como a CAT e a SOD não foram determinadas neste estudo. Além disso, deve-se levar em conta que a CAT atua no mesmo substrato que a GPx, o que pode repercutir na diminuição ou inibição desta enzima.

Complementarmente, e embora não observado neste estudo, a exposição a agentes xenobióticos também pode aumentar a atividade da GPx, tal como constatado por Carvalho *et al.* (2020), onde foi verificado que girinos de rã-touro expostos a 1 µg/L de zinco, cobre e cádmio, de forma combinada ou isolada por 2 e 16 dias, apresentaram um aumento significativo da atividade da GPx no fígado.

5.3.2. Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi significativamente maior no grupo jusante ($53,67 \pm 11,47$ nanomoles Tioéter formado/minuto/mg de proteína) em comparação com o grupo controle ($36,42 \pm 7,98$ nanomoles de Tioéter formado/minuto/mg de proteína) (Figura 8). O fato da atividade da GST estar mais elevada nos organismos expostos às águas da jusante da zona industrial, pode ser um indicativo do estresse provocado por agentes xenobióticos, ainda mais pelo fato da DQO, dióxido de nitrogênio, nitrato, íon amônio, fosfato, fósforo total dissolvido, além dos metais alumínio, bário, cádmio, cromo, potássio, e manganês, apresentarem maior concentração nas amostras coletadas no ponto à jusante da zona industrial no rio Pirajibú.

A GST é uma enzima associada a fase II do processo de biotransformação (LÜCHMANN *et al.*, 2015). Esta enzima também previne os danos oxidativos ao catalisar a conjugação de hidroperóxidos com a GSH, induzindo a desintoxicação e metabolização de vários xenobióticos (Van der Oost *et al.*, 2003). Assim, o aumento da atividade da enzima GST pode indicar um mecanismo de adaptação para conter o estresse oxidativo em anfíbios (COLTRO *et al.*, 2017), e pode conferir resistência a estes animais contra a toxicidade dos metais e outros xenobióticos.

Outros estudos também verificaram o aumento da atividade desta enzima. Carvalho *et al.* (2020) observaram a elevação da atividade de GST no fígado de girinos de rã - touro após a exposição ao zinco, cobre e cádmio, e Veronez *et al.* (2016) também verificaram o aumento da atividade GST no fígado de girinos de rã-touro após a exposição ao ferro e manganês.

Além dos metais, a exposição de anfíbios a outros xenobióticos, tais como defensivos agrícolas, também pode repercutir em um aumento da atividade da GST (RUTKOSKI *et al.*, 2020).

Este estudo não contou com a realização de análises de defensivos agrícolas, e o aumento da atividade da GST nos organismos do grupo jusante, pode ser explicada pelas maiores concentrações de metais nas águas deste ponto do rio Pirajibú, destacando que a presença dos outros compostos químicos não pode ser descartada.

5.3.3. Glutathione Reduzida (GSH)

Os resultados da GSH nas amostras de tecido do fígado de girinos de rã-touro *L. catesbeianus* (Shaw, 1802), foram muito próximos em todos os indivíduos, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre os organismos do grupo de controle ($13,68 \pm 2,63 \mu\text{M GSH/mg de proteína}$), e aqueles expostos as águas do rio Pirajibú nos pontos à montante ($11,11 \pm 2,53 \mu\text{M GSH/mg de proteína}$), e à jusante ($12,83 \pm 2,68 \mu\text{M GSH/mg de proteína}$) da zona industrial (figura 8). Isso indica que a exposição a água do rio provavelmente não provocou alterações neste biomarcador. Embora não tenha sido identificada alteração nos níveis de GSH, deve-se enfatizar que o tempo de exposição neste estudo foi de 96 horas, e que um período de exposição maior, poderia resultar em alteração nos níveis deste biomarcador entre os diferentes grupos de girinos de rã - touro. Outra questão a ser considerada é o fato da Glutathione Redutase (GR) não ter sido avaliada. Como abordado por Prokić *et al.* (2016), a GR catalisa a Glutathione Oxidada (GSSG) em Glutathione Reduzida (GSH), repondo os níveis deste biomarcador. Deste modo, a análise da GR poderia colaborar para a avaliação dos níveis de GSH.

Ademais, a Glutathione, é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), e está presente no organismo nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que sua atuação se dá em muitos processos biológicos importantes, tais como a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (JÚNIOR *et al.*, 2001). A glutathione também atua como nucleófilo e agente redutor intracelular (HERMES LIMA, 2005), e pode prevenir o estresse oxidativo protegendo o grupo sulfidril das proteínas da oxidação, e reparando aquelas que podem ter sido oxidadas pelas ERO-s. Além disso a GSH é o substrato para as enzimas GPx e

GST (CARVALHO *et al.*, 2020). Níveis elevados da GSH podem estar relacionados a proteção das proteínas celulares contra a oxidação, bem como ao próprio processo de desintoxicação induzido pela exposição a xenobióticos como os metais (WANG; FOWLER, 2008; KIM *et al.*, 2015).

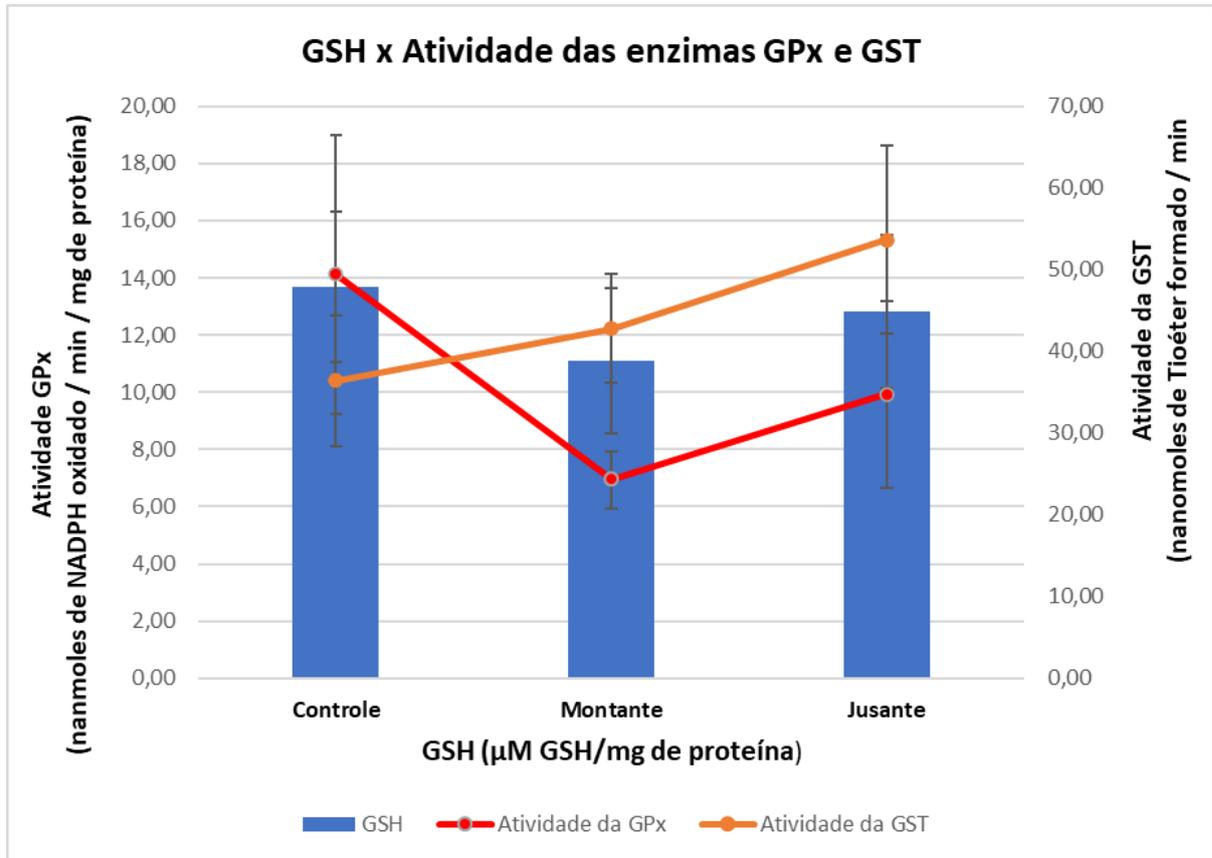
A elevação dos níveis de GSH no fígado de girinos de rã-touro foi observado por Carvalho *et al.* (2020), sendo que após 16 dias de exposição constatou-se um notável aumento de 140 – 250 % nos níveis de GSH para os indivíduos expostos aos metais zinco, cobre e cádmio de forma combinada. O aumento dos níveis de GSH também se deu no fígado de girinos de rã-touro avaliados por Fernandes *et al.* (2021), os quais identificaram que o grupo de organismos expostos as águas da represa de Itupararanga, situada próxima a cidade de Sorocaba, apresentou níveis de GSH 2,5 vezes maior em relação ao grupo controle. Não obstante, Prokić *et al.* (2016), identificaram que a presença de metais como arsênio e cádmio induziram o aumento dos níveis de GSH na pele e músculo de sapos pertencentes ao complexo *Pelophylax esculentus*. Neste estudo, Prokić *et al.* (2016) observaram ainda que a GSH e o grupo sulfidrila (SH), são componentes importantes do sistema de defesa antioxidante contra o estresse provocado pelos metais.

Por ser o substrato da GPx e GST, a GSH atua como cofator nas reações enzimáticas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Convém ressaltar que a enzima GST catalisa a conjugação da GSH tripeptídeo com várias substâncias na fase II do processo de biotransformação, desempenhando, portanto, uma função importante na prevenção do estresse oxidativo provocado por diferentes xenobióticos e seus metabólitos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A atividade da enzima GPx, e os níveis de GSH, apresentaram variações qualitativamente similares entre os 3 grupos de organismos avaliados neste estudo, no entanto essa similaridade não foi observada entre a GST e a GSH.

A despeito do comportamento observado entre os grupos, por ser o substrato da GPx e GST, a atividade destas enzimas foi dependente e influenciada pelos níveis de GSH (figura 08).

Figura 8: Níveis de GSH e a atividade das enzimas GPx e GST no fígado de girinos de rã – touro expostos por 96 horas as águas do controle, montante e jusante do rio Pirajibú (N = 8 em cada grupo).



Fonte: Elaboração própria.

5.3.4. Metabólitos – Proteínas, Glicose e Triglicerídeos

As proteínas e os lipídios são nutrientes importantes na mobilização e formação de tecido corporal, sendo os principais responsáveis pelo crescimento dos organismos. De forma específica, as proteínas participam na produção de enzimas, alguns hormônios, neurotransmissores e anticorpos, e também atuam na reposição do gasto de energia das células, transportando substâncias para o corpo (CHAGAS *et al.*, 2020).

A concentração de proteínas nos organismos no grupo controle ($7,35 \pm 1,45$ mg/mL), grupo jusante ($7,31 \pm 0,96$ mg/mL), e grupo montante ($8,51 \pm 1,43$ mg/mL), não apresentou diferenças estatisticamente significativas (figura 9). Assim a presença dos poluentes avaliados e identificados neste estudo, como os metais e compostos de fósforo e nitrogênio, não foi capaz de provocar alterações significativas na concentração de proteínas entre os três grupos analisados, o que não descarta o potencial de estresse oxidativo, mas indica que este estresse,

se existente, não foi suficiente para alterar os níveis de proteínas nos organismos, considerando o período de exposição de 96 horas.

A existência de níveis elevados de proteínas, pode ser verificado em tecidos que estão em crescimento e desenvolvimento, onde a alta concentração de proteínas está associada ao metabolismo de ácidos nucleicos, e outros processos relacionados a formação dos tecidos. Por outro lado, a elevação da concentração de proteínas também pode estar relacionada a exposição a agentes xenobióticos, e neste caso, o aumento pode representar uma resposta ao estresse oxidativo, que induz a síntese proteica associada aos mecanismos de defesa do organismo (CARVALHO *et al.*, 2017, CHAGAS *et al.*, 2020).

O aumento da concentração de proteínas foi abordado em alguns estudos, como o desenvolvido por Dornelles *et al.* (2015) e Maes *et al.* (2016). Dornelles *et al.* (2015) verificaram que os girinos de rã-touro expostos a atrazina, apresentaram um aumento na concentração de proteínas nos músculos, enquanto que a exposição ao quinclorac resultou em um aumento no total de proteínas no fígado. Já o estudo desenvolvido por Maes *et al.* (2016) foi desenvolvido no peixe *Rutilus rutilus*, e demonstrou que a concentração de proteínas nos músculos aumentou após a exposição a 10, 50 e 100 µg / L de cobre.

Em relação a concentração de glicose, a mesma não apresentou variações estatisticamente significativas entre os grupos controle ($0,44 \pm 0,13$ mg/mL), montante ($0,47 \pm 0,13$ mg/mL) e jusante ($0,37 \pm 0,07$ mg/mL) (figura 09), de modo que as diferenças na concentração de glicose são atribuídas a variabilidade aleatória existente na amostragem.

A glicose, apresenta sensibilidade a alguns poluentes ambientais, como metais e pesticidas (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Embora não tenha sido observado neste estudo, alguns autores correlacionaram o aumento da concentração de glicose nos organismos, com a exposição aos agentes xenobióticos, sendo que esta elevação está associada ao fato dos órgãos absorverem glicose durante o processo de desintoxicação, que demanda grande quantidade de energia (COLTRO *et al.*, 2017).

Na pesquisa desenvolvida por Coltro *et al.* (2017), os girinos de rã – touro expostos a 0,05 µg/L de quinclorac, apresentaram concentração de glicose plasmática de 3,28 mg/dL, enquanto nos indivíduos expostos 0,2 µg/L, essa concentração foi de 12,93 mg/dL, quase quatro vezes maior. O aumento da glicose também pode ser constatado a partir da exposição aos metais. Chagas *et al.* (2020), identificaram que a exposição ao zinco e cobre de forma isolada, resultou no aumento dos níveis de glicose no fígado de girinos de rã-touro expostos por 2 e 16 dias.

Neste sentido, apesar da concentração de glicose não se alterar significativamente neste estudo, a avaliação deste metabólito é relevante, e pode oferecer informações acerca do estresse oxidativo provocado por agentes xenobióticos. Destaca-se ainda que a inexistência de variações significativas para a glicose, não descarta a possibilidade das águas do rio Pirajibú, especialmente no ponto a jusante da zona industrial, provocarem estresse e efeitos subletais nos organismos, sendo que os níveis de glicose podem se alterar para um período de exposição mais prolongado.

Para os triglicerídeos, as concentrações foram similares nos grupos controle ($0,32 \pm 0,06$ mg/mL), montante ($0,33 \pm 0,07$ mg/mL), e jusante ($0,30 \pm 0,07$ mg/mL) (figura 09). A análise estatística indicou que as variações entre os grupos não foram significativas estatisticamente. Os triglicerídeos, associados aos metabólitos glicogênio e lipídios, agem como precursores da síntese da ATP, e são mobilizados para a liberação de energia, especialmente em situações de estresse, como a exposição a poluentes. Especificamente ao fígado, o processo de desintoxicação, que se dá principalmente neste órgão, demanda uma alta quantidade de energia, e requer a utilização dos metabólitos, dentre eles os triglicerídeos, resultando assim na sua diminuição nos outros órgãos e tecidos (SILVA *et al.*, 2020). Alguns estudos mostram que a exposição a agentes xenobióticos pode resultar na elevação dos triglicerídeos. Moura *et al.* (2017) identificaram o aumento de triglicerídeos no plasma do peixe híbrido jundiara (*Leiarius marmoratus x Pseudoplatystoma reticulatum*) exposto a uma concentração relevante de um herbicida a base de glifosato, sendo que isso pode estar associado a alterações metabólicas capazes de afetar a membrana lipídica do organismo. Ainda no que se refere ao aumento dos triglicerídeos e dos níveis de colesterol total, Youself *et al.* (2017) sugerem que isso pode ser atribuído a disfunções do metabolismo de lipídios causados pela acumulação de pesticidas no fígado, que pode resultar em mudanças na permeabilidade das células hepáticas.

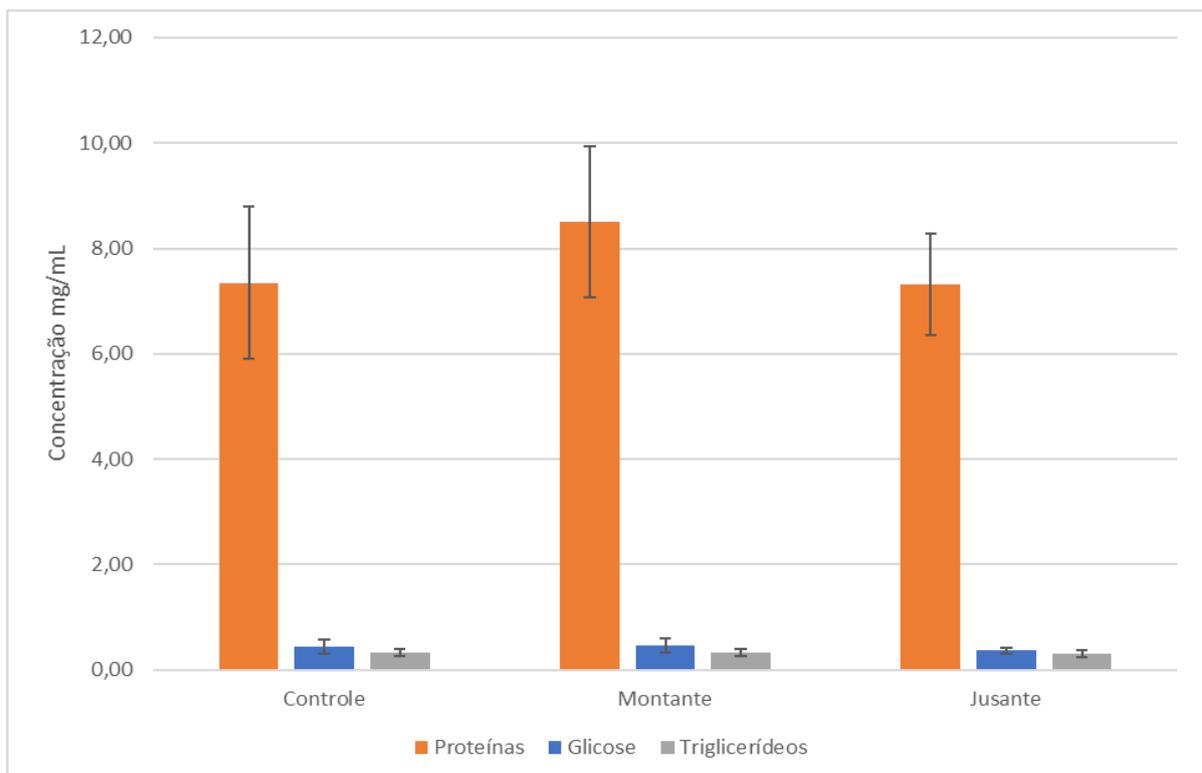
Por outro lado, a diminuição dos triglicerídeos também foi observada por alguns autores. Dornelles *et al.* (2015) verificaram que a exposição de girinos de rã – touro expostos aos pesticidas atrazina, glifosato e quinclorac, resultaram na diminuição dos triglicerídeos nas brânquias, fígado e músculo dos indivíduos expostos. Chagas *et al.* (2020), identificaram a diminuição da concentração de triglicerídeos no fígado de girinos de rã-touro expostos aos metais cádmio, cobre e zinco de forma combinada.

Os estudos disponíveis na literatura, indicam que os triglicerídeos podem ser usados para avaliar os efeitos subletais nos organismos expostos aos estressores ambientais. Assim como para os outros metabólitos analisados neste estudo, a exposição dos girinos de rã – touro

às águas do rio Pirajibú por 96 horas, não foi suficiente para provocar alterações na concentração de triglicerídeos no fígado dos organismos expostos às águas deste rio, o que porém não descarta a possibilidade desta alteração ser observada para um tempo de exposição mais prolongado.

Embora os metabólitos proteínas, glicose e triglicerídeos no fígado de girinos de rã-touro, não tenham sofrido variações significativas entre os três grupos avaliados, cabe destacar que por se tratar de um animal em desenvolvimento, é possível que estas alterações sejam identificadas em outros órgãos. No estudo desenvolvido por Chagas *et al.* (2020), os rins e o músculo dos girinos de rã – touro, foram os órgãos onde a variação de triglicerídeos foi mais afetada. Dornelles *et al.* (2015) identificaram maiores concentrações de proteínas no músculo de girinos de rã – touro expostos a atrazina, o que reforça a possibilidade de outros órgãos, especialmente o músculo, apresentarem alterações na concentração de metabólitos após a exposição aos contaminantes.

Figura 9: Concentração dos metabólitos: proteínas, glicose e triglicerídeos no fígado de girinos de rã – touro expostos por 96 horas as águas do controle, e da montante e jusante do rio Pirajibú. (N = 8 em cada grupo).



Fonte: Elaboração própria.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises físico – químicas efetuadas nas águas do rio Pirajibú, demonstraram que o ponto à jusante da zona industrial apresentou qualidade inferior à montante, o que indica a influência negativa das indústrias na qualidade das águas deste rio.

Embora as águas no ponto à jusante possuam menor qualidade, apenas a amônia, o cádmio, e o manganês superaram o valor máximo permitido por lei, corroborando a hipótese de que as águas do rio Pirajibú, não divergem expressivamente do padrão de qualidade estabelecido pela legislação ambiental para cursos d'água classe 2.

Quanto as análises bioquímicas, a enzima GPx apresentou atividade significativamente menor no grupo montante em comparação com o controle. Porém, a boa qualidade da água do controle e do ponto à montante da zona industrial, aliado ao fato desta enzima não sofrer variação entre os outros grupos, sugere que a alteração da GPx pode não estar relacionada a existência de estresse oxidativo nos organismos dos grupos controle e montante, sendo que essa hipótese poderá ser confirmada em outras pesquisas acadêmicas.

A GST possuiu atividade significativamente maior no grupo jusante em relação ao controle. Isso indica que os organismos expostos às águas deste ponto do rio, podem estar suscetíveis a sofrer estresse oxidativo, que por sua vez pode resultar em alterações fisiológicas, morfológicas ou comportamentais nestes indivíduos.

Os demais biomarcadores analisados neste estudo (GSH, proteínas, glicose e triglicerídeos), não sofreram alterações relevantes entre os grupos controle, montante e jusante, demonstrando que a exposição por 96 horas não afetou o comportamento destes biomarcadores bioquímicos.

Apesar da maioria dos biomarcadores não ter sofrido alteração, a existência de estresse oxidativo não é descartada, sobretudo à jusante da zona industrial, pois a água neste ponto possui qualidade inferior, e os organismos deste grupo apresentaram variação na enzima GST.

Para confirmar a hipótese de que os poluentes presentes no rio Pirajibú, no trecho à jusante da zona industrial, são capazes de provocar estresse oxidativo em girinos de rã-touro ou em outros organismos, para estudos futuros, propõe-se a realização de campanhas de exposição mais prolongadas, que permitam a identificação dos efeitos crônicos. Além disso, é conveniente que também sejam avaliados outros órgãos, como músculos e rins, e outros biomarcadores bioquímicos, tais como a metalotioneína, e as enzimas CAT e SOD.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS - ANA; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas**. Brasília (DF), 2011. 327 p.
- ALDRICH, Annette *et al.* Amphibians and plant-protection products: what research and action is needed. **Environmental Sciences Europe**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.1-8, 17 maio 2016.
- ALVARES, Clayton Alcarde *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, [s.l.], v. 22, n. 6, p. 711-728, 1 dez. 2013.
- AMARAL, Diogo Ferreira do *et al.* Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 686, p.332-344, out. 2019.
- AMARAL, Diogo Ferreira do *et al.* Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.600-616, 8 nov. 2018.
- AMPHIBIA WEB. Species By the Numbers. Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>>. Acesso em: 11/02/2022.
- ASSEF, Yanina A.; PRINZIO, Cecilia Y. di; HORAK, Cristina N. Differential activities of the multixenobiotic resistance mechanism in freshwater fishes inhabiting environments of Patagonia Argentina. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 217, p.32-40, mar. 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMASTÉCNICAS. **NBR 9897**: Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMASTÉCNICAS. **NBR 9898**: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.
- ASTM – American Society for Testing and Materials.2000. **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. Pp. 220-240. Philadelphia, PA.

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.

BAUDOU, Federico G. *et al.* Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 650, p.1779-1786, fev. 2019.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Méd.*, v. 61, p. 882-888, 1963.

BEKETOV, Mikhail A.; LIESS, Matthias. Ecotoxicology and macroecology – Time for integration. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 162, p.247-254, mar. 2012.

BHATTACHARYA, Shelley. Stress response to pesticides and heavy metals in fish and other vertebrates. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, Bolpur, p.215-246, 09/maio/2001.

BLAISE, Christian. Microbiotesting: An Expanding Field in Aquatic Toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 40, n. 1-2, p.115-119, maio/1998.

BLENKINSOPP, Alison; BOND, Christine; RAYNOR, David K. Medication reviews. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 74, n. 4, p.573-580, 5 set. 2012.

BO, Xiaoxue *et al.* The morphological changes and molecular biomarker responses in the liver of fluoride-exposed *Bufo gargarizans* larvae. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 151, p. 199-205, abr. 2018.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254. 1976.

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.

CARVALHO, Cleoni dos Santos *et al.* Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to diferente metals. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 445-452, 2017

CARVALHO, Cleoni dos Santos *et al.* Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 196, p. 1-9, jun. 2020.

CATENAZZI, Alessandro. State of the World's Amphibians. **Annual Review of Environment and Resources**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.91-119, 4 nov. 2015.

CERVENY, Daniel *et al.* Young-of-the-year fish as a prospective bioindicator for aquatic environmental contamination monitoring. **Water Research**, [s.l.], v. 103, p.334-342, out. 2016.

CHAGAS, B.R.C. *et al.* Metabolic responses in bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 233, p. 1-11, jul. 2020.

CHAOUSIS, Stephanie; LEUSCH, Frederic D.l.; MERWE, Jason P. van de. Charting a path towards non-destructive biomarkers in threatened wildlife: A systematic quantitative literature review. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 234, p.59-70, mar. 2018.

COLTRO, Mariana de Lima *et al.* Influence of the Herbicide Facet® on Corticosterone Levels, Plasma Metabolites, and Antioxidant System in the Liver and Muscle of American Bullfrog Tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 228, n. 7, p. 228-241, 9 jun. 2017.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Norma Técnica L5.227 – Teste de Toxicidade com Bactéria Luminescente *Vibrio fischeri*: Método de Ensaio**. 2001.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2018. 284 p. Disponível em:<https://cetesb.sp.gov.br/aguasinteriores/wpcontent/uploads/sites/12/2019/10/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-SP-2018.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2020.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Sistema Infoáguas**. 2022. Disponível em: < <https://cetesb.sp.gov.br/infoaguas/>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

CONNON, Richard E.; GEIST, Juergen; WERNER, Inge. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. **Sensors**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.12741-12771, 18 set. 2012.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 18 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Brasília, DF.

CORRÊA, Carina Júlia Pensa; TONELLO, Kelly Cristina; FRANCO, Fernando Silveira. 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, 25 out. 2016.

CURMI, Elizabeth *et al.* An integrated representation of the services provided by global water resources. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 129, p.456-462, nov. 2013.

DAHMS-VERSTER S. *et al.* Biochemical responses revealed in an amphibian species after exposure to a forgotten contaminant: An integrated biomarker assessment, **Environmental Toxicology and Pharmacology** (2019).

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

MOURA, F.R *et al.* Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 241-248, 2017.

DENOËL, Mathieu *et al.* Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.1240-1250, 1 mar. 2012.

DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA – DAEE. **Pesquisa de Dados dos Recursos Hídricos do Estado de São Paulo**. 2022. Disponível em: <<http://www.aplicacoes.dae.sp.gov.br/usuarios/fchweb.html>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

DONATO, M. Teresa; CASTELL, V. Strategies and Molecular Probes to Investigate the Role of Cytochrome P450 in Drug Metabolism. **Clinical Pharmacokinetics**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.153-178, 2003. Springer Nature

DOKKEN, Betsy B. *et al.* Inhibition of Nitric Oxide Synthases, But Not Inducible Nitric Oxide Synthase, Selectively Worsens Left Ventricular Function After Successful Resuscitation From Cardiac Arrest in Swine. **Academic Emergency Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.197-203, 29 jan. 2015.

DORNELLES, M. F. *et al.* Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 1610-1620, 18 set. 2015.

DUAN, Weili *et al.* Water Quality Assessment and Pollution Source Identification of the Eastern Poyang Lake Basin Using Multivariate Statistical Methods. **Sustainability**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 133-148, 30 jan. 2016.

EVARISTE, Lauris *et al.* Gut microbiota of aquatic organisms: A key endpoint for ecotoxicological studies. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 248, p.989-999, maio 2019.

FASOLA, E.; RIBEIRO, R.; LOPES, I. Microevolution due to pollution in amphibians: A review on the genetic erosion hypothesis. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 204, p.181-190, set. 2015.

FÉRARD, Jean-françois. Ecotoxicology: Historical Overview and Perspectives. In: FÉRARD, Jean-françois; BLAISE, Christian (Ed.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. New Delhi: Springer Netherlands, 2013. p. 377-386.

FERNANDES, Isabela Ferreira *et al.* Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (). **Chemosphere**, [S.L.], v. 275, jul. 2021

FLOHÉ, I., GUNZLER, W.A., 1984. **Assays of glutathione peroxidase**. *Methods Enzymol.* 105, 114-121.

FRANÇA, Júnior Farias de *et al.* Determination of 17 α -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 192, n. 1, p. 1-10, 9 dez. 2019.

GARCIA, Thaís de Almeida. **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.

GENDRON, Andrée. Amphibian Ecotoxicology. In: FÉRARD, Jean-francois; BLAISE, Christian (Ed.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. New Delhi: Springer Netherlands, 2013. p. 377-386.

GHEZZI, Pietro *et al.* Oxidative Stress and Inflammation Induced by Environmental and Psychological Stressors: A Biomarker Perspective. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 28, n. 9, p.852-872, 20 mar. 2018.

GOMES, Fernando *et al.* Proteolytic cleavage by the inner membrane peptidase (IMP) complex or Oct1 peptidase controls the localization of the yeast peroxiredoxin Prx1 to distinct mitochondrial compartments. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 292, n. 41, p.17011-17024, 18 ago. 2017.

GOSSET, Antoine; FERRO, Yannis; DURRIEU, Claude. Methods for evaluating the pollution impact of urban wet weather discharges on biocenosis: a review. **Water Research**, [S.L.], v. 89, p. 330-354, fev. 2016.

GROOPMAN, John D.. Biomarkers of Exposure, Effect, and Susceptibility. In: MCQUEEN, Charlene A. (Ed.). **Comprehensive Toxicology - Third Edition**. Elsevier, 2018. p. 188-201.

GÜNGÖRDÜ, Abbas; UÇKUN, Miraç; YOLOĞLU, Ertan. Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. **Chemosphere**, [s.l.], v. 144, p.2024-2035, fev. 2016.

HAGE, David s; CARR, James D. **Química analítica e análise quantitativa**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012. 724 p.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C.. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. ed. Oxford University Press, 2007. 896 p.

HERMES-LIMA, Marcelo *et al.* Oxygen in Biology and Biochemistry: role of free radicals. **Functional Metabolism**, [S.L.], p. 319-368, 28 jan. 2005.

IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A.. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 287-293, 1 dez. 2018.

ISACHENKO, A. G. Geographical roots of ancient civilizations (on the 120th anniversary of L.I. Mechnikov's Civilization and Great Historical Rivers). Part I. **Regional Research of Russia**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.91-98, jan. 2011.

JAYAWARDENA, Uthpala Apekshani *et al.* Heavy metal-induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 36, n. 10, p.2855-2867, 19 jun. 2017.

JONES-COSTA, Monica *et al.* Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 151, p.184-190, abr. 2018.

KAHRU, Anne; DUBOURGUIER, Henri-charles. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, [s.l.], v. 269, n. 2-3, p.105-119, 10 mar. 2010.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B., 1976. **Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases**. J. Biol. Chem. 251, 6183–6188.

KIM, Jun-Hwan *et al.* Oxidative stress, neurotoxicity, and non-specific immune responses in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, exposed to different waterborne selenium concentrations. **Chemosphere**, [S.L.], v. 135, p. 46-52, set. 2015.

KOROLEFF, M. Determination of nutrients. In: Grasshoff, K. (ed). **Methods of sea water analysis**. Verlag Chemie Weinheim. 1976. 317 p.

KOUMAKI, Elena; MAMAIS, Daniel; NOUTSOPOULOS, Constantinos. Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 323, p.233-241, fev. 2017.

KÜHNERT, Agnes *et al.* Biotransformation in the zebrafish embryo –temporal gene transcription changes of cytochrome P450 enzymes and internal exposure dynamics of the AhR binding xenobiotic benz[a]anthracene. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 230, p.1-11, nov. 2017.

- LAM, Paul K.S.; GRAY, John S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v.46, p. 182-186, 2003.
- LEONARD, Paul. The role of biological research in supporting policy needs. **Marine Environmental Research**, [S.L.], v. 54, n. 3-5, p. 209-213, set. 2002.
- LI, Hongyan *et al.* Landfill leachate ingestion induces protein oxidation and DNA–protein crosslinks in mouse viscera. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 174, n. 1-3, p.54-58, fev. 2010.
- LI, Shuaizhang *et al.* Use of high-throughput enzyme-based assay with xenobiotic metabolic capability to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphorous pesticides. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 56, p. 93-100, abr. 2019.
- LIONETTO, M.G. *et al.* Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.324-330, mar. 2003.
- LIU, Changhui *et al.* Genotoxicity of perfluorinated chemicals (PFCs) to the green mussel (*Perna viridis*). **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 487, p.117-122, jul. 2014.
- LIU, Xiaochen *et al.* Exploring spatiotemporal changes of the Yangtze River (Changjiang) nitrogen and phosphorus sources, retention and export to the East China Sea and Yellow Sea. **Water Research**, [S.L.], v. 142, p. 246-255, out. 2018.
- LIVINGSTONE, David R. Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. London, p. 195-211. jan. 1993.
- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 120, n. 1, p.43-49, maio 1998.
- LOURO, Henriqueta *et al.* Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [s.l.], v. 222, n. 5, p.727-737, jun. 2019.

LÜCHMANN, Karim H. *et al.* Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 166, p.10-20, set. 2015.

MAES, Virginie *et al.* Juvenile roach (*Rutilus rutilus*) increase their anaerobic metabolism in response to copper exposure in laboratory conditions. **Ecotoxicology**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 900-913, 31 mar. 2016.

MANFREDINI, Fábio Navarro. **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.

MANN, Reinier M. *et al.* Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 157, n. 11, p.2903-2927, nov. 2009.

MELVIN, Steven D. Oxidative stress, energy storage, and swimming performance of *Limnodynastes peronii* tadpoles exposed to a sub-lethal pharmaceutical mixture throughout development. **Chemosphere**, [s.l.], v. 150, p.790-797, maio 2016.

MOSCHINO, Vanessa *et al.* Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s.l.], v. 177, n. 1-4, p.649-663, 3 set. 2010.

MOURA, F.R. *et al.* Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 241-248, 2017.

MURRAY, Kyle E.; THOMAS, Sheeba M.; BODOUR, Adria A.. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 158, n. 12, p.3462-3471, dez. 2010.

NOWELL, Lisa H. *et al.* Pesticide Toxicity Index—A tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 476-477, p.144-157, abr. 2014.

NÜßER, Leonie K. *et al.* A sensitive biomarker for the detection of aquatic contamination based on behavioral assays using zebrafish larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 133, p.271-280, nov. 2016.

OOST, Ron van Der; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico P.e. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.57-149, fev. 2003.

PAUL, Kimberly C. *et al.* Organophosphate Pesticide Exposures, Nitric Oxide Synthase Gene Variants, and Gene–Pesticide Interactions in a Case–Control Study of Parkinson’s Disease, California (USA). **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 124, n. 5, p.570-577, maio 2016.

PEREIRA, Lilian Paula Faria; MERCANTE, Cacilda Thais Janson. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo/SP, v. 1, n. 31, p. 81-88, jun. 2005.

PÉREZ-ALVAREZ, Itzayana *et al.* Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 240, p.330-341, set. 2018.

PINTO-VIDAL, Felipe Augusto *et al.* Metabolic, immunologic, and histopathologic responses on premetamorphic American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) following exposure to lithium and selenium. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 270, p. 116086, fev. 2021.

PROKIĆ, Marko D. *et al.* Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. **Ecotoxicology**, [S.L.], v. 25, n. 8, p. 1531-1542, 15 set. 2016.

RODRIGUES, Elsa Teresa; PARDAL, Miguel Ângelo. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. **Environment International**, [s.l.], v. 70, p.158-182, set. 2014.

ROVER JÚNIOR, Laércio *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 112-119, fev. 2001.

RUTKOSKI, Camila F. *et al.* Cypermethrin- and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 4377-4387, 17 set. 2020.

SALAMI, Adebayo Wahab *et al.* Morphometrical Analysis and Peak Runoff Estimation for the Sub-Lower Niger River Basin, Nigeria. **Slovak Journal of Civil Engineering**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 6-16, mar. 2016.

SANTANA, Manuela S. *et al.* Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 242, p.449-461, nov. 2018.

SÃO PAULO (Estado). **DataGeo**: Infraestrutura de Dados Espaciais Ambientais do Estado de São Paulo. Disponível em: <https://datageo.ambiente.sp.gov.br/>. Acesso em: 08 ago. 2020.

SÃO PAULO (Estado). Decreto nº 8468, de 08 de setembro de 1976. **Aprova o Regulamento da Lei n.º 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente**. São Paulo, SP.

SÃO PAULO (Estado). Lei nº 16337, de 14 de dezembro de 2016. **Dispõe Sobre O Plano Estadual de Recursos Hídricos - PERH e dá Providências Correlatas**. São Paulo, SP.

SCHEEPERS, Paul T.j.; COCKER, John. Human biomonitoring with or without limits? Progress in the analysis of biomarkers of xenobiotics and some opportunities for improved interpretation. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 113, p.116-123, abr. 2019.

SCHWARTZ, D.; COLLINS, F. MEDICINE: Environmental Biology and Human Disease. **Science**, [s.l.], v. 316, n. 5825, p.695-696, 4 maio 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

SHARLEY, David J. *et al.* Detecting long-term temporal trends in sediment-bound trace metals from urbanised catchments. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 219, p.705-713, dez. 2016.

SIEVERS, Michael *et al.* Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 693, p.1-10, nov. 2019.

SILVA, Patrícia Rodrigues da *et al.* Melanophryniscus admirabilis tadpoles' responses to sulfentrazone and glyphosate-based herbicides: an approach on metabolism and antioxidant defenses. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 4156-4172, 15 set. 2020.

SIMMONS, D. B. D. *et al.* Altered expression of metabolites and proteins in wild and caged fish exposed to wastewater effluents in situ. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-14, dez. 2017.

SLABY, Sylvain *et al.* Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 248, p.478-495, maio 2019.

SK, Ugir Hossain; BHATTACHARYA, Sudin. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by a series of novel organoselenocyanates. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 298-308, nov. 2006.

Standard Methods for Examination of Water & Wastewater, 21 st ed. **American Public Health Association**, Washington, DC. 2005.

STECKLING, Nadine *et al.* Biomarkers of exposure in environment-wide association studies – Opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data. **Environmental Research**, [s.l.], v. 164, p.597-624, jul. 2018.

STRYDOM, C *et al.* The effect of selected metals on the central metabolic pathways in biology: A review. **Water Sa**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.543-554, 10 dez. 2006. Academy of Science of South Africa.

TRUHAUT, René. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.151-173, set. 1977.

U.S. EPA. 2007. **Method 3051A (SW-846)**: Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils, Revision 1. Washington, DC.

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

VERONEZ, Alexandra Caroline da Silva *et al.* Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 174, p. 101-108, maio 2016.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2ª Ed., Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.

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

WANG, Gensheng *et al.* Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 233, n. 1, p. 92-99, nov. 2008.

WEN, Yizhang *et al.* Application of an ammonium ion-selective electrode for the real-time measurement of ammonia nitrogen based on pH and temperature compensation. **Measurement**, [s.l.], v. 137, p. 98-101, abr. 2019.

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

WHILES, M. R. *et al.* Disease-Driven Amphibian Declines Alter Ecosystem Processes in a Tropical Stream. **Ecosystems**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.146-157, 7 nov. 2012.

WILD, C. P. Complementing the Genome with an: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.1847-1850, 1 ago. 2005. American Association for Cancer Research (AACR).

YOLOGLU, Ertan; OZMEN, Murat. Low concentrations of metal mixture exposures have adverse effects on selected biomarkers of *Xenopus laevis* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 168, p.19-27, nov. 2015.

YOUSEF, M.I. *et al.* Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. **Toxicology**, [S.L.], v. 189, n. 3, p. 223-234, ago. 2003.

ZHOU, Bian-Hua *et al.* Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. **Chemosphere**, [S.L.], v. 139, p. 504-511, nov. 2015.

APENDICE – A

Tabela 8: Monitoramento rio Pirajibú ponte SP 075 na divisa de Sorocaba e Itu.

Parâmetro	Data da coleta em 2018/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	09/01	08/03	08/05	17/07	13/09	27/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Alumínio dissolvido (mg/L)	<0,1	–	<0,1	<0,1	–	0,26	–	0,1
Bário (mg/L)	0,04	–	0,02	0,03	–	0,05	1	0,7
DBO (mgO ₂ /L)	2,0	2,0	5,0	12,0	19,0	9,0	5,0	
Ferro dissolvido (mg/L)	0,55	–	0,37	0,31	–	0,60	–	0,30
Fluoreto (mg/L)	1,62	1,04	0,7	0,75	1,05	3,43	1,4	
Fósforo (mg/L)	0,18	0,22	0,42	0,78	0,45	0,21	-	0,1
Manganês (mg/L)	0,2	–	0,09	0,12	–	0,45	–	0,1
Nitrato (mg/L)	1,49	1,17	2,39	2,21	1,96	0,73	10,0	
Nitrito (mg/L)	0,041	0,029	0,068	0,084	0,16	0,11	1,0	
O.D (mgO ₂ /L)	6,8	6,2	6,2	6,2	2,6	4,4	OD> 5,0	
pH	6,67	6,52	7,28	7,05	6,81	6,71	6,0 < pH < 9,0	
Surfac- tantes (mg/L)	0,08	0,09	0,22	0,09	–	–	Sem valor de referência	

Continuação da tabela 8: Monitoramento rio Pirajibú ponte SP 075 na divisa de Sorocaba e Itu.

Parâmetro	Data da coleta em 2018/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2
	09/01	08/03	08/05	17/07	13/09	27/11	
Ensaio Microtox [®] (CE 20%)	>81,9	–	>81,9	>81,9	–	>81,9	Referência presente no Índice de qualidade das águas (CETESB,2018) ^(a)

Fonte: Elaborado a partir do sistema Infoáguas, CETESB (2020).

(a) Atóxica: $CE(20\%) > 81,90\%$ / Moderadamente tóxico $50 < CE(20\%) \leq 81,90\%$,

Tóxica: $25\% < CE(20\%) \leq 50\%$ / Muito tóxica: $CE(20\%) \leq 25\%$.

(b) Os parâmetros boro, cádmio, chumbo, cobre, mercúrio, níquel e zinco, também foram analisados no monitoramento feito pela CETESB, sendo que a concentração destes parâmetros em todas as amostras analisadas, situou-se abaixo do limite de quantificação (L.Q) do laboratório, razão pela qual não foram expressos no tabela 10.

Tabela 9: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2015.

Parâmetro	Data da coleta em 2015/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	14/01	11/03	13/05	22/07	08/09	12/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Alumínio dissolvido (mg/L)	<0,1	–	0,27	<0,1	–	<0,1	–	0,1
Bário (mg/L)	0,06	–	0,06	0,04	–	0,06	1	0,7
Boro (mg/L)	0,05	–	0,06	0,05	–	<0,03	–	0,5
DBO (mgO ₂ /L)	5,0	5,0	4,0	4,0	9,0	4,0	5,0	
Ferro dissolvido (mg/L)	1,04	–	0,44	0,42	–	0,88	–	0,3
Fluoreto (mg/L)	2,37	–	2,46	1,86	–	2,41	1,4	
Fósforo (mg/L)	0,49	0,23	0,33	0,40	0,54	0,25	-	0,1
Manganês (mg/L)	0,58	–	0,11	0,15	–	0,28	–	0,1
Nitrato (mg/L)	<0,20	0,53	2,29	<0,20	0,30	0,62	10,0	
Nitrito (mg/L)	<0,1	0,2	<0,1	0,33	<0,1	0,18	1,0	
O.D (mgO ₂ /L)	1,10	2,0	3,4	1,6	2,2	1,78	OD > 5,0	
pH	7,30	6,80	6,80	7,40	7,21	7,10	6,0 < pH < 9,0	
Surfac- tantes (mg/L)	0,42	–	0,18	0,32	–	0,21	Sem valor de referência	

Continuação da tabela 9: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2015.

Parâmetro	Data da coleta em 2015/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	14/01	11/03	13/05	22/07	08/09	12/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Zinco (mg/L)	<0,02	–	0,06	<0,02	–	<0,02	5,0	0,18
Ensaio Microtox® (CE 20%)	>81,9	–	>81,9	>81,9	–	>81,9	Referência presente no Índice de qualidade das águas (CETESB,2018) ^(a)	

Fonte: Elaborado a partir do sistema Infoáguas, CETESB (2020).

(a) Atóxica: $CE(20\%) > 81,90\%$ / Moderadamente tóxico $50 < CE(20\%) \leq 81,90\%$,

Tóxica: $25\% < CE(20\%) \leq 50\%$ / Muito tóxica: $CE(20\%) \leq 25\%$.

(b) Outros metais como cádmio, cobre, mercúrio e níquel, também foram analisados pela CETESB, sendo que os resultados não constam na tabela 11, pois a concentração destes parâmetros foi menor que o limite de quantificação (L.Q) do laboratório em todas as amostras analisadas.

Tabela 10: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2016.

Parâmetro	Data da coleta em 2016/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	13/01	09/03	11/05	13/07	15/09	17/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Alumínio dissolvido (mg/L)	0,39	–	<0,1	<0,1	–	<0,1	–	0,1
Bário (mg/L)	0,06	–	0,04	0,04	–	0,05	1	0,7
DBO (mgO ₂ /L)	<2,0	4,0	3,0	3,0	<2,0	<2,0	5,0	
Ferro dissolvido (mg/L)	0,69	–	0,36	0,45	–	0,78	–	0,3
Fluoreto (mg/L)	1,45	–	1,31	0,93	–	1,28	1,4	
Fósforo (mg/L)	0,14	0,19	0,27	0,25	0,30	0,21	-	0,1
Manganês (mg/L)	0,05	–	0,08	0,13	–	0,17	–	0,1
Nitrato (mg/L)	0,34	1,36	1,09	1,90	0,78	1,26	10,0	
Nitrito (mg/L)	<0,1	0,22	0,18	0,19	0,12	0,17	1,0	
O.D (mgO ₂ /L)	3,90	2,20	2,10	2,40	1,50	2,00	OD> 5,0	
pH	6,90	7,00	7,20	7,00	7,19	7,08	6,0 < pH < 9,0	
Surfac- tantes (mg/L)	0,08	–	0,18	0,19	–	0,10	Sem valor de referência	

Continuação da tabela 10: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2016.

Parâmetro	Data da coleta em 2016/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	13/01	09/03	11/05	13/07	15/09	17/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Ensaio Microtox® (CE 20%)	>81,9	–	>81,9	>81,9	–	>81,9	Referência presente no Índice de qualidade das águas (CETESB,2018) ^(a)	

Fonte: Elaborado a partir do sistema Infoáguas, CETESB (2020).

(a) Atóxica: CE (20%) > 81,90 % / Moderadamente tóxico 50 < CE (20%) ≤ 81,90 %,

Tóxica: 25 % < CE (20%) ≤ 50 % / Muito tóxica: CE (20%) ≤ 25 %.

(b) Outros metais como boro, cádmio, cobre, mercúrio e níquel, também foram analisados pela CETESB, sendo que os resultados não constam na tabela 12, pois a concentração destes parâmetros foi menor que o limite de quantificação (L.Q) do laboratório em todas as amostras analisadas.

Tabela 11: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2017.

Parâmetro	Data da coleta em 2017 / resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	05/01	09/03	23/05	11/07	19/09	21/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Alumínio dissolvido (mg/L)	0,18	–	0,67	<0,1	–	0,30	–	0,1
Bário (mg/L)	0,06	–	0,05	0,04	–	0,05	1	0,7
DBO (mgO ₂ /L)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	5,0	
Ferro dissolvido (mg/L)	0,84	–	0,52	0,44	–	0,40	–	0,3
Fluoreto (mg/L)	0,86	1,29	1,18	0,57	0,73	0,96	1,4	
Fósforo (mg/L)	0,20	0,21	0,10	0,19	0,29	0,26	-	0,1
Manganês (mg/L)	0,18	–	0,05	0,1	–	0,18	–	0,1
Nitrato (mg/L)	1,02	0,84	0,52	1,78	1,24	1,38	10,0	
Nitrito (mg/L)	0,12	0,086	0,039	0,19	0,14	0,15	1,0	
O.D (mgO ₂ /L)	2,20	2,80	5,40	4,00	2,90	2,90	OD> 5,0	
pH	6,91	6,92	6,93	6,97	7,08	7,01	6,0 < pH < 9,0	
Surfac- tantes (mg/L)	<0,08	–	<0,08	0,11	–	<0,08	Sem valor de referência	

Continuação da tabela 11: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2017.

Parâmetro	Data da coleta em 2017/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	05/01	09/03	23/05	11/07	19/09	21/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Ensaio Microtox [®] (CE 20%)	>81,9	–	>81,9	>81,9	–	>81,9	Referência presente no Índice de qualidade das águas (CETESB,2018) ^(a)	

Fonte: Elaborado a partir do sistema Infoáguas, CETESB (2020).

(a) Atóxica: CE (20%) > 81,90 % / Moderadamente tóxico 50 < CE (20%) ≤ 81,90 %,

Tóxica: 25 % < CE (20%) ≤ 50 % / Muito tóxica: CE (20%) ≤ 25 %.

(b) Outros metais como boro, cádmio, cobre, mercúrio e níquel, também foram analisados pela CETESB, sendo que os resultados não constam na tabela 13, pois a concentração destes parâmetros foi menor que o limite de quantificação (L.Q) do laboratório em todas as amostras analisadas.

Tabela 12: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2018.

Parâmetro	Data da coleta em 2018/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	09/01	08/03	08/05	17/07	13/09	27/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Alumínio dissolvido (mg/L)	<0,1	–	<0,1	<0,1	–	0,57	–	0,1
Bário (mg/L)	0,05	–	0,03	0,03	–	0,05	1	0,7
DBO (mgO ₂ /L)	<2,0	<2,0	<2,0	4,0	3,0	4,0	5,0	
Ferro dissolvido (mg/L)	0,84	–	0,27	0,23	–	0,99	–	0,3
Fluoreto (mg/L)	1,15	1,05	0,77	0,73	1,20	2,03	1,4	
Fósforo (mg/L)	0,20	0,25	0,45	0,83	0,69	0,23	-	0,1
Manganês (mg/L)	0,16	–	0,09	0,13	–	0,13	–	0,1
Nitrato (mg/L)	1,61	1,42	2,33	0,25	0,73	0,54	10,0	
Nitrito (mg/L)	0,18	0,20	0,16	0,09	0,26	0,065	1,0	
O.D (mgO ₂ /L)	2,60	2,50	2,80	2,10	2,20	4,30	OD> 5,0	
pH	6,90	7,10	7,12	7,18	7,04	6,78	6,0 < pH < 9,0	
Surfac- tantes (mg/L)	0,13	–	0,11	0,40	–	0,13	Sem valor de referência	

Continuação da tabela 12: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2018.

Parâmetro	Data da coleta em 2018/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	09/01	08/03	08/05	17/07	13/09	27/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Ensaio Microtox® (CE 20%)	>81,9	–	>81,9	>81,9	–	>81,9	Referência presente no Índice de qualidade das águas (CETESB,2018) ^(a)	

Fonte: Elaborado a partir do sistema Infoáguas, CETESB (2020).

(a) Atóxica: CE (20%) > 81,90 % / Moderadamente tóxico $50 < CE (20\%) \leq 81,90 \%$,

Tóxica: $25 \% < CE (20\%) \leq 50 \%$ / Muito tóxica: $CE (20\%) \leq 25 \%$.

(b) Outros metais como boro, cádmio, cobre, mercúrio e níquel, também foram analisados pela CETESB, sendo que os resultados não constam na tabela 14, pois a concentração destes parâmetros foi menor que o limite de quantificação (L.Q) do laboratório em todas as amostras analisadas.

Tabela 13: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2019.

Parâmetro	Data da coleta em 2019/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	08/01	12/03	21/05	16/07	10/09	05/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Bário (mg/L)	0,05	–	0,05	0,04	–	<0,02	1	0,7
Chumbo (mg/L)	<0,007	–	<0,007	<0,007	–	0,010	0,1	0,01
DBO (mgO ₂ /L)	2,0	2,0	3,0	3,0	5,0	4,0	5,0	
Ferro dissolvido (mg/L)	0,81	–	0,62	0,42	–	0,23	–	0,3
Fluoreto (mg/L)	1,63	1,33	0,60	0,67	2,36	1,00	1,4	
Fósforo (mg/L)	0,24	0,18	0,24	0,22	0,30	1,41	-	0,1
Manganês (mg/L)	0,10	–	0,06	0,05	–	0,94	–	0,1
Nitrato (mg/L)	2,03	1,71	2,60	2,27	0,95	0,94	10,0	
Nitrito (mg/L)	0,15	0,19	0,22	0,21	0,16	0,12	1,0	
O.D (mgO ₂ /L)	3,40	3,89	3,91	4,50	3,40	2,80	OD> 5,0	
pH	7,06	6,98	7,05	6,52	7,01	7,41	6,0 < pH < 9,0	
Surfac- tantes (mg/L)	0,20	–	0,13	0,11	–	0,10	Sem valor de referência	

Continuação da tabela 13: Monitoramento rio Pirajibú no bairro vitória régia em Sorocaba no ano 2019.

Parâmetro	Data da coleta em 2019/ resultado da amostra (Valores acima do permitido em negrito)						Valor de referência para rio classe 2	
	09/01	08/03	08/05	17/07	13/09	27/11	Decreto 8468/1976	Conama 357/2005
Ensaio Microtox [®] (CE 20%)	>81,9	–	>81,9	>81,9	–	>81,9	Referência presente no Índice de qualidade das águas (CETESB,2018) ^(a)	

Fonte: Elaborado a partir do sistema Infoáguas, CETESB (2020).

(a) Atóxica: CE (20%) > 81,90 % / Moderadamente tóxico 50 < CE (20%) ≤ 81,90 %,

Tóxica: 25 % < CE (20%) ≤ 50 % / Muito tóxica: CE (20%) ≤ 25 %.

(b) Outros metais como alumínio, boro, cádmio, cobre, mercúrio e níquel, também foram analisados pela CETESB, sendo que os resultados não constam na tabela 15, pois a concentração destes parâmetros foi menor que o limite de quantificação (L.Q) do laboratório em todas as amostras analisadas.