

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

REGIANE LUIZA DA COSTA

**IMPACTO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO
SEDIMENTÁVEL EMITIDO POR INDÚSTRIAS METALÚRGICAS
EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*)**

SÃO CARLOS -SP
2025

REGIANE LUIZA DA COSTA

IMPACTO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO
SEDIMENTÁVEL EMITIDO POR INDÚSTRIAS METALÚRGICAS
EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Ambientais da Universidade Federal
de São Carlos, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutora em Ciências
Ambientais¹.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro

¹ Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Costa, Regiane Luiza da

IMPACTO DO MATERIAL PARTICULADO
ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL EMITIDO POR
INDÚSTRIAS METALÚRGICAS EM GIRINOS DE RÃ-
TOURO (Aquarana catesbeiana) / Regiane Luiza da Costa
-- 2024.
127f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Diana Amaral Monteiro

Banca Examinadora: Evelise Nunes Fragoso de Moura,
Marisa Narciso Fernandes, Victor Hugo da Silva Braga,
Fernando Fabrizzi

Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Função Cardíaca . 3.
Genotoxicidade . I. Costa, Regiane Luiza da. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Regiane Luiza da Costa, realizada em 20/12/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro (UFSCar)

Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura (UFSCar)

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Victor Hugo da Silva Braga (UNESP)

Prof. Dr. Fernando Fabrizzi (FUNEPE)

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

Dedico a Maria Luiza e ao Benjamim.

Que o universo possa responder às suas curiosidades. Mas, se em algum momento encontrarem um universo de portas fechadas, com pouca sabedoria para responder às suas intermináveis perguntas, lembrem-se de respirar profundamente, fortalecer os braços, e esticar as pernas. Entrem pela janela, se necessário, e saibam que estarei ao lado de vocês, acompanhando cada passo e sendo confiante nos erros e acertos, nos desafios e conquistas.

AGRADECIMENTOS

Por ter segurança em todos os momentos da minha vida, ter um coração cheio de amor e de gratidão, reconheço essa energia vem de uma fonte inesgotável, que é o amor de Deus em três pessoas: o Pai, o Filho e o Espírito Santo. Não há palavras em nenhum idioma que consigam expressar o quanto eu O amo e sou grata!

Pelo acontecimento de coisas inexplicáveis aos olhos humanos, por livramentos que foram concedidos pela intercessão de Nossa Senhora da Conceição Aparecida, por me ensinar sobre o amor mais puro, o amor de uma mãe para com sua filha, e por me escolher para ser Sua devota.

Agradeço imensamente à grande Doutora da Igreja Católica, Santa Terezinha do Menino Jesus, meu modelo de vida. Confesso que é um padrão altíssimo a ser seguido, mas sou insistente na busca por ser pequena, para contemplar as misericórdias e todo o amor nos braços do Belíssimo Esposo.

Agradeço a Delza e Jovenal, meus pais, que escolheram constituir uma família e, principalmente, permanecerem unidos mesmo diante de tantas adversidades, sendo testemunho vivo da fé. Agradeço aos meus irmãos, meus pequenos tesouros, que me ajudaram a construir de cada tijolo dessa longa jornada.

Pela orientação, exigência e critério, bem como pela oportunidade de aprender novas metodologias para a avaliação de impacto ambiental na biota aquática, agradeço à Professora Diana por cada umas das lições e ensinamentos sobre a vida e a profissão, tenho muita gratidão.

Por indicações valiosas, pelo acesso aos equipamentos, recursos humanos e financeiros, infraestrutura e pela oportunidade de ter participado de um projeto temático, fatores fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, bem como o desenvolvimento da pesquisa, sou grata a senhora Professora Marisa.

Por tanto aprendizado que recebi e vivenciei no Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais (PPGCAM-UFSCar). O diferencial do PPGCAM está no olhar humano e no acolhimento de cada professor, ensinando que todas as ciências são importantes para a resolução de problemas.

Ao professor Vandoir Bourscheidt, sou grata por ser naturalmente tão gentil e generoso. Suas palavras tão sábias e acolhedoras permitiram-me seguir adiante e confiar mais em mim mesma.

Ao professor Frederico Yuri Hanai, sinto-me honrada pela oportunidade de conhecê-lo e por todo o aprendizado recebido. A sua polidez, ética, amabilidade, e doçura em cada uma das palavras, gestos, olhares o torna um ser humano tão grandioso.

Agradeço imensamente aos professores da minha banca de qualificação de aula teórica: Prof. Dr. Marcel Tanaka, cuja didática é uma das mais excepcionais que já presenciei; Prof. Dr. Frederico Yuri Hanai e Prof. Dr. Luiz Eduardo Moschini. Foi uma experiência enriquecedora ser avaliada presencialmente por uma banca de professores incríveis e qualificados.

Expresso meu profundo agradecimento, aos professores e professoras que em muito contribuíram para a correção, análise e aprimoramento da minha tese de doutorado: Profa. Dra Iara Costa, Prof. Dr. Victor Saito e Prof. Dr. Fernando Fabrizzi, membros da banca de qualificação do trabalho escrito. Agradeço, a Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura, Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, Prof. Dr. Victor Hugo da Silva Braga e novamente ao Prof. Dr. Fernando Fabrizzi, que integraram a banca de defesa. Minha profunda gratidão pelo tempo, dedicação e valiosas contribuições ao longo desse processo.

Agradeço imensamente ao meu diretor espiritual Padre Kenny Erick Araújo Desidério, que me ensinou como ser feliz com minha pequenez e a compreender que não há comparação entre as histórias e caminhos de cada ser humano.

À minha animadíssima, e festeira Comunidade da Paróquia São Cristóvão – São Carlos: Padre Kenny, Seminarista Yan, Fran, Fátima, Téo, Matheus, Regiane, Douglas, Cristian, Daniel, Paulo, Nazaré, Mari, Loiane, Lu; as crianças da catequese Apolo, Mauro, Alana, Alane, Daniel, Valentina. Todos vocês, adultos e crianças, foram fundamentais para que eu pudesse me aproximar ainda mais do amor de Deus e fortalecer ainda mais a minha fé.

A família mato-grossense que me adotou em São Carlos, Regiane, Douglas, Cristian e Daniel. Ainda bem que um mato-grossense reconhece o outro “só de olhar” mesmo que esteja a quilômetros de distância de sua terra natal.

A querida Suammy Priscila Rodrigues Leite Cordeiro, presente de Deus que o IFMT-Várzea Grande me concedeu, primeiro como minha professora no curso de Tecnologia em

Gestão Pública e depois como minha amiga e agora como amiga/professora/líder. Obrigada por ser tão afetuosa, amável, educada, gentil por escutar minhas vivências ao longo do doutorado, por tamanho apoio, e inúmeras orações.

Pela singularidade de cada uma das histórias que conheci e que compartilhamos momentos comigo, além da ajuda tão necessária em cada uma das etapas da pesquisa de doutoramento, Yan, Bruno, Suzana, Gustavo, Iara, Maira, Hevellyn, Anielli, Carol, Israel, Vivi.

Por ter me ensinado tanto e com tamanha paciência e seriedade, Luana, obrigada pelos feriados, chuva, sol, frio ou calor, e as caminhadas diárias de cerca de 5 km para ir e voltar do laboratório, a responsabilidade era maior que qualquer intemperismo. A sempre tão sutil, mas tão assertiva, foi pouco o tempo que passamos juntas Mari, mas seu exemplo é algo que cada um de nós, estudantes, queremos conquistar.

Por tantos conselhos, pela leveza, por conversas acolhedoras na pós graduação, obrigada pelo olhar tão maternal, acolhedor, Professora Sônia Buck e Professora Heloisa Sobreiro, por seu olhar e abraços tão maternais.

Por cada aconselhamento assertivo na vida acadêmica, obriga Tatiana e Péricles por sempre me escutarem, e me motivarem nessa jornada vivenciada, obrigada por torcerem por mim.

Pelo trabalho de tantos anos, por tamanha dedicação à causa ambiental obrigada Eraylton Moreschi, presidente da ONG SOS Juntos ES Ambiental, pelo apoio logístico na coleta do material particulado atmosférico sedimentável e por ser um exemplo da gestão participativa no Estado do Espírito Santo.

Por três mulheres brilhantes, gentis, educadíssimas, amorosas, generosas, professoras, pesquisadoras, espelhos de vida: Fernanda Pereira Shults minha orientadora da monografia, Daniela Maimoni Figueiredo orientadora do mestrado e Márcia Teixeira de Oliveira minha co-orientadora do mestrado.

Por confiarem em mim Professor Ibraim Fantin da Cruz e Professor Felipe Franco Curcio, obrigada por terem sido essenciais no meu doutoramento, por nossas conversas, pelo apoio.

Por uma amizade afável, acolhedora, divertida, obrigada Tatiana Aparecida Gonçalves (*in memoriam*) por ter sido tão afetuosa comigo, por ter cuidado de mim quando estive doente

em São Carlos. Por ter me apoiado mesmo não entendendo o que eu fazia na universidade, mas mesmo assim me motivou para ser forte e resiliente, assim como você foi em vida e agora deve estar aí no céu olhando por mim.

Ao Alan, Bea, Raquel, Léo, pelo acolhimento, pelos passeios, feiras, baladas, shows, forrozinho pé de serra, por nossas conversas, e aos rolês mais aleatórios possíveis e inimagináveis em São Carlos. Por minhas amigas, conselheiras, confidentes de Mato Grosso, Janaína, Waléria e Simone obrigada por vivenciarem de forma tão próxima o período de doutorado. Principalmente, Jana, obrigada por ser minha amiga e partilharmos da mesma fé.

Agradeço ao carinho verdadeiro da vegah (*in memoriam*), baby, dumbo, foca, cabrita, caramelo, bolota, leão, vider e wilson definitivamente já nasceram prontos para amar, algo que nós, humanos, raramente aprendemos.

Por fim, expresso minha sincera gratidão a cada um dos brasileiros e brasileiras que, por meio do pagamento dos seus impostos financiaram de forma direta e indireta essa pesquisa e minha bolsa de doutorado e o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradecimento à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**, pela concessão da minha bolsa de estudos. Agradecimento a **FAPESP processo 2019/08491-0** pelo suporte financeiro para a realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**.

(...) No teu caminho o que havia? Vi Cristo ressuscitado (...)

João 20, 18

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

COSTA, R.L. – IMPACTO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL EMITIDO POR INDÚSTRIAS METALÚRGICAS EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*) 2025 - 127p: Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, São Carlos – 2025.

O material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) é composto por metais e metaloides que, ao serem depositados na água, podem causar impactos na biota aquática. Este estudo avaliou a bioconcentração de metais e metaloides, os efeitos genotóxicos e mutagênicos, além dos biomarcadores de fisiológicos e bioquímicos em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) expostos por 96 horas a uma concentração subletal e ambientalmente relevante de MPASe (1g/L^{-1}). O MPASe foi coletado na Ilha do Boi, em Vitória-ES, uma área com intensa atividade siderúrgica e metalúrgica. A exposição ao MPASe causou bioconcentração de metais no sangue, como Sn, Cr, La, Ce, Al, Ag, Pb, Ti e Fe. O MPASe também causou aumento de 25% no índice hepatossomático e a diminuição de 12% no fator de condição indicando alterações da saúde dos animais. A concentração de hemoglobina e a contagem total de células aumentaram em 17% e 112% respectivamente. Efeitos mutagênicos nos eritrócitos foram indicados por meio do aumento de 340% na frequência de micronúcleos. No teste cometa, ocorreu aumento em parâmetros como área do cometa (44,91%) e no conteúdo de DNA na cauda (85,49%), apontando danos genotóxicos. No tecido cardíaco, foram quantificadas elevadas concentrações de Ti, Fe, V, Ba e Mn, confirmando a bioconcentração. A exposição ao MPASe aumentou a frequência cardíaca em 28% e diminuiu a massa ventricular relativa em cerca de 19%. Nos parâmetros da contratilidade cardíaca, ocorreu um aumento de 60% na força de contração, 50% na taxa de contração, 55% na taxa de relaxamento e 66% na capacidade de bombeamento cardíaco. O bloqueio do trocador NCX resultou em redução significativa nos grupos controle e exposto respectivamente de 39% e 49% na força de contração, 25% e 4% na taxa de contração, 47% e 40% na taxa de relaxamento e cerca de 58% e 64% na capacidade de bombeamento cardíaco, indicando que o trocador tem um papel significativo na ciclagem de cálcio. Os níveis de proteína carbonilada aumentaram 80%, a razão GSH:GSSG aumentou 121% e os níveis de ACAP aumentaram 37% no tecido cardíaco. Os resultados indicaram que, mesmo em concentração subletal, o MPASe demonstrou potencial genotóxico e mutagênico, causando alterações no sangue. Adicionalmente, a exposição ao MPASe induziu respostas cronotrópicas, inotrópicas e lusitrópicas positivas, como respostas compensatórias típicas de estresse. Os resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco revelaram mecanismos e estratégias para neutralizar as espécies reativas de oxigênio. Este estudo fornece evidências de que as partículas metálicas do MPASe, provenientes de indústrias metalúrgicas, são indutoras de danos e podem comprometer a homeostase fisiológica, mesmo em exposição de curta duração e em concentração subletal, reforçando a necessidade de uma legislação mais rigorosa para o controle da emissão desse material.

Palavras-chave: Anfíbios; Genotoxicidade; Mutagenicidade; Função Cardíaca; Metais.

ABSTRACT

COSTA, R.L. – IMPACT OF SETTLEABLE PARTICULATE MATTER (SePM) EMITTED BY METALLURGICAL INDUSTRIES ON BULLFROG TADPOLES (*Aquarana catesbeiana*) 2025 - 127p :Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, São Carlos – 2025.

The settleable particulate matter (SePM), is composed of metals and metalloids which, when deposited in water, can use impacts on the aquatic biota. This study assessed the bioaccumulation of metals, genotoxic and mutagenic effects, as well as physiological and biochemical biomarkers in bullfrog tadpoles (*A. catesbeiana*), exposed 96 hours to a sublethal and environmentally relevant concentration of SePM (1 g/L⁻¹). The SePM was collected on Ilha do Boi, in Vitória, ES, an area with intense steel and metallurgy activity. The results indicated bioaccumulation of metals in the blood, such as Sn, Cr, La, Ce, Al, Ag, Pb, Ti, and Fe. Health alterations were observed in the animals, with a 25% increase in the hepatosomatic index and a 12% decrease in the condition factor. Hemoglobin concentration and total cell count increased by 17% and 112%, respectively. Mutagenic effects on erythrocytes were indicated by a 340% increase in micronucleus frequency. In the comet assay, there was a significant increase in comet area (44.91%) and DNA content in the tail (85.49%), indicating genotoxic damage. In the heart tissue, high concentrations of Ti, Fe, V, Ba, and Mn were quantified, confirmed bioaccumulation. SePM exposure increased heart rate by 28% and decreased relative ventricular mass by 19%. Cardiac contractility parameters, showed a 60% increase in contraction strength, 50% in contraction rate, 55% in relaxation rate, and 66% in cardiac pumping capacity. The blockage of the NCX exchanger resulted in a significant reduction in the control group and exposed groups, respectively, of 39% and 49% in contraction force, 25% and 4% in contraction rate, 47% and 40% in relaxation rate, and approximately 58% and 64% in cardiac pumping capacity, indicating that the exchanger plays a significant role in calcium cycling. Protein carbonyl levels increased by 80%, the GSH:GSSG ratio increased by 121% and ACAP levels increased by 37% in cardiac tissue. These results indicate that even at a sublethal concentration, SePM demonstrated genotoxic and mutagenic potential, causing alterations in the blood. Additionally, exposure to SePM induce chronotropic, inotropic, and lusitropic responses, as typical compensatory stress responses. The results of oxidative stress biomarkers in cardiac tissue revealed mechanisms and strategies to neutralize reactive oxygen species. This study provides evidence that metallic particles from SePM, originating from metallurgical industries, induce damage and may compromise physiological homeostasis, even with short-term exposure and at sublethal concentrations, reinforcing the need for stricter regulations to control the emission of this material.

Keywords: Amphibians; Genotoxicity; Mutagenicity; Cardiac Function; Metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Partículas agregadas do MPASe bruto.....	27
Figura 2- Acúmulo de pó preto em um hotel na Ilha do Boi – ES	27
Figura 3- Sedimentação do MPASe no solo e na água.....	29
Figura 4- Fonte de MPASe e deposição em ambientes aquáticos.	29
Figura 5- Micronúcleos formados por cromossomos atrasados e fragmentos acêntricos.	33
Figura 6- Teste cometa nucleoides sem danos (A) com danos (B e C).....	34
Figura 7- Acoplamento excitação-contração de mamífero.....	35
Figura 8- Esquema simplificado da produção de espécies reativas (EROs), diminuição dos compostos antioxidantes, estresse oxidativo e danos celulares.	38
Figura 9- Rã-touro (<i>Aquarana catesbeiana</i>) em um ranário comercial.	41
Figura 10- Girinos de rã-touro (<i>Aquarana catesbeiana</i>) em tanque de experimentação.	42
Figura 11- Localização do Complexo do Tubarão e da Ilha do Boi, Vitória - ES	47
Figura 12- Atividades metalúrgicas do Complexo do Tubarão e da Ilha do Boi, Vitória - ES.....	48
Figura 13- Fator de bioconcentração (FBC) de metais e metaloides no sangue total de girinos de rã-touro (<i>Aquarana catesbeiana</i>) expostos a 1 g.L-1 de MPASe por 96 h.....	60

Figura 14- (A) Fator de condição (FC), (B) Índice hepatossomático (IHS), (C) Conteúdo de hemoglobina (Hb) e (D) Contagem total de células do sangue (CBC) de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). 62

Figura 15- Células sanguíneas de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*). Setas indicam (A) linfócito, (B) monócito, (C) basófilo, e (D) neutrófilo. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), ampliação de 100×, barra 10 µm. 65

Figura 16- Frequência de (A) micronúcleo (MN) e (B) soma de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) no sangue periférico de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). 66

Figura 17- Anormalidades nucleares eritrocitárias de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*). (A) Micronúcleo, (B) célula apoptótica, (C) núcleos com bolha, (D) núcleo lobado, (E) núcleo entalhado (F) célula anucleada. Ampliação 100×, barra 10 µm. 67

Figura 18- Teste cometa em girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe. (A) Controle, sem danos no DNA. (B) MPASe, com danos ao DNA. Barra = 50 µm. 70

Figura 19- (A) Concentração de ferro; (B) Concentração de bário e zinco; (C) Concentração de titânio, vanádio, manganês, molibdênio, prata e cromo, no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n:3). 80

Figura 20- Fator de bioconcentração (FBC) de metais e metaloides no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) expostos a 1 g.L⁻¹ de MPASe durante 96 h (n:3). 81

Figura 21- (A) Frequência cardíaca (bpm) e (B) Massa ventricular relativa (MVR) no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe. 83

Figura 22- (A) Força de contração (Fc), (B) Capacidade de Bombeamento Cardíaco (CBC), (C) taxa de contração, (D) taxa de relaxamento das tiras ventriculares de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe. 85

Figura 23- (A, B) Força de contração, (C, D) Capacidade de bombeamento cardíaco, (E, F) taxa de contração, (G, H) taxa de relaxamento das tiras ventriculares de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct / Ct+Li e MPASe/MPASe + Li (n = 12)..... 89

Figura 24- (A) Níveis de lipoperoxidação (LPO), (B) DNA Strand-break (DNA-SB) (B), (C) Proteína carbonilada do tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). 90

Figura 25- (A) Níveis de glutathiona reduzida (GSH), (B) Níveis de glutathiona oxidada (GSSG), (C) razão GSH:GSSG (D) Capacidade Antioxidante Total de (*Aquarana catesbeiana*) do tecido cardíaco de girinos de rã-touro dos grupos Ct e MPASe (n = 12)..... 93

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) no MPASe (n=3) coletado na Ilha do Boi, Vitória, ES, Brasil, em outubro /2020. Os valores são média \pm E.P.M. LOD: Limite de determinação. LOQ: Limite de quantificação. a54
- Tabela 2-** Concentrações de metais/metaloídes dissolvidos ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em amostras de água (n = 3) dos grupos Ct e MPASe ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) colhidas ao final do experimento (96 h). Os valores são média \pm E.P.M. LOD: Limite de determinação. LOQ: Limite de quantificação. 55
- Tabela 3-** Concentração de metais/metaloídes ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no sangue total (n = 3) de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$). LOD: Limite de determinação. LOQ: Limite de quantificação. Os valores são média \pm E.P.M. 57
- Tabela 4-** Frequências de células sanguíneas diferenciais de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). Os valores são média \pm E.P.M 64
- Tabela 5-** Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). Os valores são média \pm E.P.M. 68
- Tabela 6-** Danos no DNA de eritrócitos de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados usando o teste t não pareado. 69

TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP	2',2'-azobis-2-metilpropinamidina di-hidrocloro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACAP	Capacidade antioxidante total
Ag	Prata
Al	Alumínio
ANEs	Anormalidades Nucleares Eritrocitárias
AP	Células apoptóticas
As	Arsênio
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Adenosine TriPhosphate
AVMA	American Veterinary Medical Association
Ba	Bário
BHT	Butilato hidroxitolueno
Bi	Bismuto
BL	Núcleos com bolhas
BN	Células binucleadas
bpm	Batimentos por minuto
BSA	Albumina bovina
CA	Área do cometa
CAT	Catalase
CBC	Capacidade de bombeamento cardíaco
CBC	Contagem total de células do sangue
Cd	Cadmio
Ce	Cério
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr	Cromo
CRM	Material de Referência Certificado
CSA	Área de seção transversa
Cu	Cobre
dFc/dT	Taxa de Contração

-dFc/dT	Taxa de Relaxamento
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FBC	Fator de Bioconcentração
FC	Fator de condição
Fc	Força de contração
Fe	Ferro
FOX	Ferrous oxidation-xylenol orange
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
Hb	Hemoglobina total
HCL	Ácido Clorídrico
Hg	Mercúrio
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
ICYTAC	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Córdoba
IEMA	Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
IHS	Índice hepatossomático
La	Lantânio
LB	Núcleos lobados
LOD	Límite de detecção
LOQ	Límite de quantificação
LPO	Lipoperoxidação
LTCC	Canais de Ca ²⁺ Tipo L
Mn	Manganês
MN	Micronúcleo
Mo	Molibdênio
MPA	Material particulado atmosférico

MPASe	Material particulado atmosférico sedimentável
MVR	Massa ventricular relativa
NA	Células anucleadas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nb	Nióbio
NCX	Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
Ni	Níquel
NT	Núcleos entalhados
ONG	Organização Não Governamental
OM	Momento olive da cauda
PAS	Ácido periódico de Schiff
Pb	Chumbo
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Proteína Carbonilada
PM	Material particulado
PN	Núcleo picnótico
PTFE	Polímero politetrafluoretileno
Rb	Rubídio
RM	Núcleo reniforme
Se	Selênio
Sn	Estanho
SOD	Superóxido dismutase
Sr	Estrôncio
TC	Conteúdo de DNA da cauda
TCA	Ácido tricloroacético
Ti	Titânio
TL	Comprimento da cauda
TM	Momento da cauda
TNB	Ácido Tió-Nitrobenzóico
TOC	Carbono orgânico total
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultravioleta
V	Vanádio
VA	Células vacuoladas

W	Tungstênio
Y	Ítrio
Zn	Zinco
Zr	Zircônio

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1	Contextualização	24
1.2	Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPASe)	25
1.3	Biomarcadores de Genotoxicidade e Mutagenicidade	31
1.4	Biomarcadores Fisiológicos	34
1.5	Biomarcadores de Estresse Oxidativo	37
1.6	Anfíbios.....	38
1.6.1	Considerações sobre a espécie <i>Aquarana catesbeiana</i> (Shaw, 1802).....	40
1.7	Justificativa	43
1.8	Hipótese.....	43
1.9	Objetivo geral.....	44
1.9.1	Objetivos específicos	44
2	CAPÍTULO II - EFEITOS TÓXICOS, GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E	
	BIOACUMULATIVOS PROVOCADOS POR EXPOSIÇÃO AO MATERIAL	
	PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL EM GIRINOS DE RÃ-TOURO	
	<i>Aquarana catesbeiana</i> (SHAW, 1802)	46
2.1	Apresentação	47
2.2	Materiais e Métodos	47
2.2.1	Área de coleta.....	47
2.2.2	Cuidados com animais e exposição ao MPASe	48
2.2.3	Determinação de metais e metaloides	50
2.2.4	Parâmetros hematológicos.....	51
2.2.5	Mutagenicidade e Contagem diferencial	51
2.2.6	Genotoxicidade.....	52
2.2.7	Análise estatística.....	53
3.3	Resultados e Discussão	54
3.4	Conclusão	71
3	CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO	
	MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL EMITIDO POR	
	INDÚSTRIAS METALÚRGICAS SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE GIRINOS DE	
	RÃ-TOURO (<i>Aquarana catesbeiana</i>)	72
3.1	Apresentação	73

3.2	Materiais e Métodos	73
3.2.1	Área de coleta	73
3.2.2	Cuidados com animais e exposição ao MPASe	74
3.2.3	Análise no ICP-MS	74
3.2.4	Parâmetros fisiológicos	75
3.2.5	Preparo dos tecidos.....	76
3.2.6	Níveis de lipoperoxidação (LPO).....	77
3.2.7	DNA-Strand-break	77
3.2.8	Níveis de proteína carbonilada (PC)	78
3.2.9	Níveis de glutathiona na forma reduzida (GSH) oxidada (GSSG)	78
3.2.10	Capacidade antioxidante total (ACAP)	79
3.2.11	Análise estatística.....	79
3.3	Resultados e Discussão	80
3.4	Conclusão	96
4.	CAPÍTULO IV- CONCLUSÃO GERAL	98
5.	REFERÊNCIAS	101

1. CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contextualização

Esta tese de doutorado teve como objeto de pesquisa o material particulado atmosférico (MPA) com capacidade de sedimentação (MPASe), um potencial poluidor do ambiente terrestre e aquático, oriundo das indústrias de beneficiamento de minério de ferro no Estado do Espírito Santo, Brasil. Essa região abriga um dos maiores centros de beneficiamento de minério – o Complexo Siderúrgico de Tubarão. O MPASe é composto de uma mistura de partículas que contêm diversos metais, sendo fundamental monitorar os impactos desse poluente para compreender como a exposição poderia afetar a biota aquática, principalmente em animais como os anfíbios.

A existência desse grupo animal é antiga, provavelmente na Terra há cerca de 350 milhões de anos, tendo como ancestral os peixes pulmonados (Boschilia, 2010; Storer *et al.*, 2003). Durante o estágio larval, esses animais entram em contato direto com as substâncias disponíveis na água e no sedimento, através da pele e das brânquias (Wake e Koo, 2018). Algumas espécies de anfíbios, após a exposição a diferentes contaminantes desenvolveram mutações no núcleo de células sanguíneas, quebras na fita de DNA, hiperplasia, alterações no crescimento, na reprodução entre outros impactos (Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Veronez *et al.*, 2016).

Dessa forma, os anfíbios se destacam entre os vertebrados como o grupo mais suscetível à contaminação e intoxicação (Alimba *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2021). Devido ao seu ciclo de vida duplo, os anfíbios atuam como conectores entre os ambientes terrestres e aquáticos, facilitando a transferência de contaminantes para as cadeias alimentares, como ocorre quando são ingeridos por aves (Sullivan e Rodewald, 2012). Na presente pesquisa, girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) foram selecionados para exposição ao MPASe em ambiente controlado, uma vez que o estágio larval é o que apresenta maior susceptibilidade a contaminantes (Alimba *et al.*, 2018; Benvindo-Souza *et al.*, 2020).

Esta espécie é um modelo animal tradicionalmente utilizado na biologia experimental, principalmente em estudos ecotoxicológicos (Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Chagas *et al.*, 2020). Adicionalmente, ela é comercializada em ranários, o que facilita a sua aquisição, além de ser uma espécie exótica na fauna brasileira, representando uma alternativa ao uso das espécies nativas (Akmentins e Cardozo, 2010). Isso é particularmente relevante diante dos inúmeros registros de declínio das populações de anfíbios, particularmente, das espécies de ocorrência restrita no território brasileiro (Frost, 2024; Seixas Filho, Pereira e Melo, 2017).

Os impactos ambientais na biota aquática estão se tornando cada vez mais complexos, exigindo novas ferramentas para diagnosticar e avaliar a magnitude dos efeitos dos contaminantes na água e nos organismos que utilizam como habitat (Boudou e Ribeyre, 1997). Nesse contexto, a Ecotoxicologia vem ganhando destaque, pois busca compreender os efeitos dos poluentes sobre diferentes populações de seres vivos (Silva, Pompêo e Paiva, 2015).

Para alcançar esse objetivo, são realizadas exposições em modelos animais seguidas de análises que consigam mostrar os efeitos letais e subletais em diversos aspectos biológicos, incluindo biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos (Fernandes *et al.*, 2021; Oliveira, 2014; Walker *et al.*, 2012). Esse tipo de experimentação foi empregada nesta pesquisa, pois até o momento não há uma análise detalhada que forneça resultados sobre efeitos subletais de toxicidade, mutagenicidade, e alterações na fisiologia cardíaca dos anfíbios, decorrentes da exposição ao MPASe. Assim, esta pesquisa buscou investigar se o MPASe emitido por indústrias metalúrgicas poderia ser incluído como uma ameaça à conservação dos anfíbios.

Essas análises quando tomadas em conjunto, fornecem informações valiosas que podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas para a conservação ambiental, da água, e das espécies de anfíbios. Além disso, são de grande interesse para as Ciências Ambientais, que buscam, por meio da integração de saberes, solucionar ou mitigar problemas ambientais de forma sistêmica. A transversalidade da pesquisa acadêmica permite a aplicação dos conhecimentos científicos a diversos grupos, especialmente órgãos governamentais responsáveis pela gestão ambiental e, dessa forma, o conhecimento científico pode alcançar diferentes setores da sociedade.

Acredita-se que novas discussões e a divulgação dessas informações podem influenciar o estabelecimento de critérios mais rigorosos e específicos para os limites de lançamentos de resíduos atmosféricos. Até o momento, está investigação sobre os efeitos da contaminação por MPASe na interface ar-água em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) é pioneira e merece atenção significativa devido à sua relevância. Isso se deve ao fato de que essa fonte de contaminação não é contemplada nos protocolos de monitoramento ambiental (Monteiro *et al.*, 2023a, 2023b).

1.2 Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPASe)

O MPASe tem em sua composição metais e metaloides resultantes do beneficiamento do minério de ferro, transporte, pelotização (conglomerado de finos de minérios de ferro em pequenas esferas usadas na fabricação do aço) e produção de aço

(Galvão *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018). Souza *et al.* (2021) descreveram que MPASe coletado na Região da Grande Vitória especificamente na Ilha do Boi – ES no período de março de 2018, foi composto por 21 metais: Boro (B), Alumínio (Al), Titânio (Ti), Vanádio (V), Cromo (Cr), Manganês (Mn), Ferro (Fe), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Rubídio (Rb), Estrôncio (Sr), Ítrio (Y), Zircônio (Zr), Nióbio (Nb), Estanho (Sn), Bário (Ba), Lantânio (La), Cério (Ce), Mercúrio (Hg) e Chumbo (Pb).

Monteiro *et al.* (2023) descreveram que o MPASe coletado na mesma área, no período de março de 2021, apresentou em sua composição 19 metais, com ausência dos metais B, Hg e Nb. Essa diferença pode ser atribuída a diversos fatores, como mudanças nas fontes de poluição, nas condições meteorológicas que influenciam a dispersão e a sedimentação das partículas atmosféricas, além do impacto no período pandêmico nas atividades industriais.

O MPASe apresenta diferenças em relação ao material particulado gerado pela emissão de veículos automotores, que é predominantemente composto por carbono oriundo da queima de combustíveis fósseis (Santos *et al.*, 2017). Ainda segundo os autores, esta fonte de poluição pode conter, em sua composição metais como o Zn e o Cu.

De acordo com Galvão *et al.* (2018) a Região da Grande Vitória é uma região urbana e industrializada, com cerca de 717 mil veículos, composta de automóveis (71%), motocicletas (19%), caminhões (4%), ônibus (1%) e outros (5%). Além disso, há cerca de 88 indústrias registradas como potenciais fontes de poluição, como uma empresa de mineração, uma siderúrgica e atividades portuárias no Complexo de Tubarão. Em conjunto esses elementos contribuem para as diferentes fontes de emissão e dispersão de MPASe.

Os autores utilizaram a técnica de difração de raios-x por luz síncroton para identificar as fontes de emissão de MPASe, tanto industriais quanto veiculares, em amostras coletadas na Enseada do Suá e na Ilha do Boi, áreas diretamente influenciadas por atividades potencialmente poluidoras. Os resultados mostraram que o MPASe industrial, proveniente de siderúrgicas e processamento de minérios apresentou teores altos de óxidos de ferro, como hematita e magnetita. Em contraste, o MPA de origem veicular, derivado da queima de combustíveis fósseis e desgaste de freios e pneus, apresentou menores concentrações de óxidos de ferro, e maiores concentrações de Ba, o qual é associado ao desgaste desses componentes automotivos.

O MPASe é comumente chamado de “pó preto” (Figura 1) pela população residente em áreas próximas ao complexo industrial, origina-se de uma fumaça metálica produzida

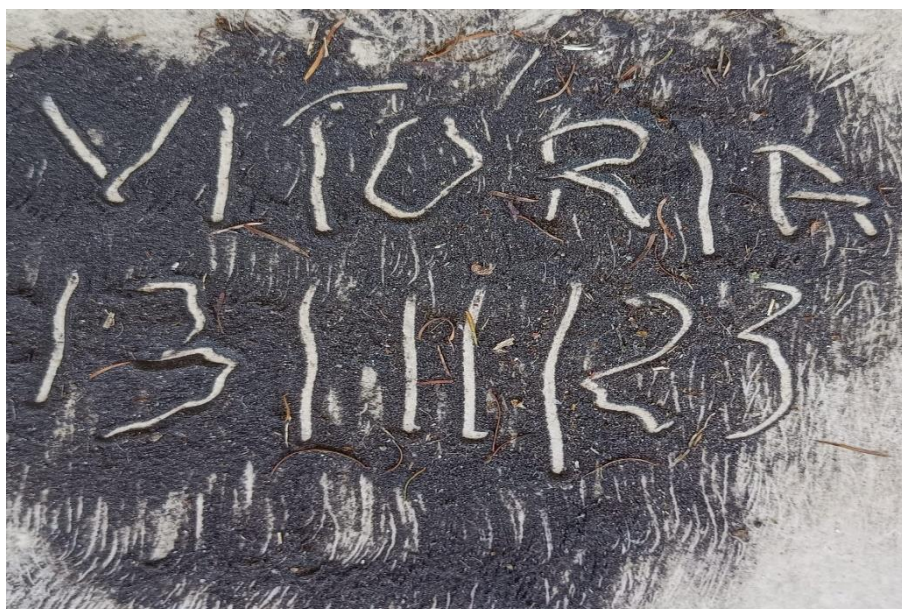
durante o beneficiamento do minério de ferro. A persistente deposição do MPASe gera um aspecto de sujeira nas calçadas, em casas (Figura 2). Esse impacto ambiental vai além da alteração estética dos ambientes, exigindo atenção e a implementação de medidas mitigadoras adequadas.

Figura 1- Partículas agregadas do MPASe bruto.



Fonte: ONG Juntos SOS Ambiental (2021)

Figura 2- Acúmulo de pó preto em um hotel na Ilha do Boi – ES



Fonte: ONG Juntos SOS Ambiental (2023)

O MPASe apresenta partículas de tamanhos visíveis a olho nu e materiais microscópicos incluindo as nanopartículas menores que 100 nm (Souza *et al.*, 2019, 2022). O MPA apresenta tamanho variável, sendo classificado em função do diâmetro aerodinâmico

médio das partículas (Olivatto, Costa e Bourscheidt, 2023). Esses critérios de classificação são fundamentais para a compreensão do impacto na saúde humana e ambiental. Assim, de acordo com Freitas e Solci (2009) as partículas inaláveis possuem diâmetro médio de 2,5 a 10 μm (partículas grossas), e as partículas respiráveis apresentam diâmetro médio é inferior a 2,5 μm (partículas de diâmetro médio).

Por fim, as partículas quasi-ultrafinas (MP_{0,25}) com diâmetro inferior a 0,25 μm ; e ultrafinas (MP_{0,10}) com diâmetro inferior a 0,1 μm são particularmente preocupantes devido a capacidade de carregar poluentes químicos e metálicos, potencializando os riscos de doenças respiratórias incluindo câncer de pulmão e doenças cardiovasculares (Freitas e Solci, 2009; Minguillón *et al.*, 2008; Olivatto, Costa e Bourscheidt, 2023).

A variação do tamanho das partículas do MPA e do MPASe pode estar relacionada às características e aos tipos das fontes emissoras. Souza *et al.*, (2021a) realizaram a coleta do MPASe em uma área infralitoral próxima ao Complexo de Tubarão e constataram que ele é predominantemente composto de hematita e quartzo. As partículas menores (PM 10) contem concentrações mais elevadas de metais, sendo o Fe constituinte da maior parte dos metais (cerca de 80%), seguido de Al, Ti e Mn.

De acordo com Souza *et al.* (2018, 2021a) uma fração do MPASe ao ser sedimentado na água (Figura 3), permanece biodisponível para a biota residente em ambiente aquático (Figura 4), principalmente após a dissociação onde compostos metálicos se separam e formam íons metálicos como o Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} . Enquanto, a maioria dos elementos do material particulado sedimenta, uma fração (3 a 10%) permanece suspensa na coluna d'água, dependendo das propriedades físico-químicas do metal (Fortes *et al.*, 2023).

A biodisponibilidade de metais pesados, refere-se a extensão ou taxa na qual a fração das concentrações de metais está disponível para absorção por organismos vivos em várias matrizes ambientais como o solo, sedimento e água (Adams *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2015). Esses metais, podem ser transportados pela membrana celular, distribuídos sistemicamente e acumulados em diversos órgãos gerando vários efeitos deletérios à saúde (Monteiro *et al.*, 2023a, 2023b).

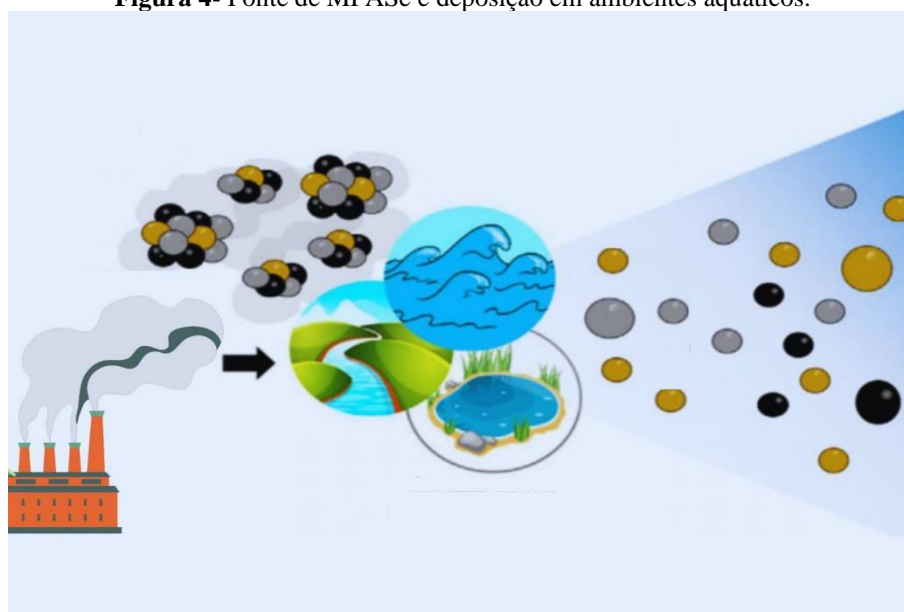
Figura 3- Sedimentação do MPASe no solo e na água



Fonte: ONG Juntos SOS Ambiental (2022)

Souza *et al.* (2018) descreveram que o MPASe é incorporado pela biota aquática ao longo da cadeia trófica de um manguezal no Espírito Santo, incluindo plâncton, camarões, caranguejos, ostras e peixes. Esses estudos mostram a potencial transferência de metais nos diferentes organismos e gera um alerta nas questões relativas à conservação das espécies.

Figura 4- Fonte de MPASe e deposição em ambientes aquáticos.



Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2021a)

O Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em

colaboração com pesquisadores e pesquisadoras da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Universidade de Córdoba (Argentina), Universidade de Hull (Inglaterra) e da ONG Juntos SOS Ambiental (Vitória-ES, Brasil) vem conduzindo estudos nos estuários e manguezais da região da Grande Vitória (Baía de Vitória) e em Santa Cruz-ES.

A dinâmica dos estudos desenvolvidos por esse grupo de pesquisadores e pesquisadoras inclui pesquisas e coletas de dados ambientais em áreas de estuários, mangues e também estudos em laboratório, nos quais grupos de animais vertebrados e invertebrados são expostos a diferentes concentrações de MPASe. Após a exposição a essa mistura metálica, vários efeitos adversos foram observados e descritos por pesquisadores em fitoplâncton, zooplâncton, animais e plantas, detalhados a seguir.

Souza *et al.* (2014a) avaliaram como *Laguncularia racemosa* absorve e transloca metais e metaloides. O estudo examinou as mudanças anatômicas e histoquímicas nas raízes dessa espécie em dois estuários no Espírito Santo, Brasil. Os pesquisadores analisaram 14 elementos em água intersticial, sedimentos e tecidos vegetais. Os resultados mostraram uma correlação entre os metais presentes na água e aqueles encontrados nas plantas. Adicionalmente *L. racemosa* exibiu variações na anatomia radicular conforme os níveis de poluição das áreas de coleta. Na área mais poluída, a Baía de Vitória, a espécie mostrou mudanças significativas na relação córtex/cilindro vascular, na espessura da periderme e na área do espaço de ar nas raízes.

Souza *et al.* (2014b) realizaram a coleta de exemplares da espécie *Rhizophora mangle*, em três áreas de mangue, com o objetivo de avaliar a relação entre os níveis de contaminação ambiental por metais e as alterações na anatomia radicular e foliar dessa planta, os autores realizaram a coletada de folhas e raízes, da espécie vegetal e avaliaram a coloração histoquímica, e a análise de concentração de metais. Após análise os autores observaram que em locais com poluição mais intensa as plantas exibiram alterações morfológicas como folhas e raízes mais espessas, e acúmulo de metais pesados nesses órgãos. Evidenciando que *R. mangle* é um bom bioindicador de mudanças ambientais no manguezal.

O estudo de Souza *et al.* (2015) teve como objetivo avaliar a acumulação e translocação de metais do sedimento para raízes e folhas de *Avicennia schaueriana*, que cresceram em áreas com diferentes graus de contaminação. Os resultados dessa pesquisa evidenciaram que as mudanças na anatomia da raiz podem estar relacionadas a bioacumulação de metais. Os resultados desse estudo demonstraram que as maiores concentrações de metais foram encontradas nas raízes das plantas, enquanto que, nas folhas foram observadas menores concentrações provavelmente relacionada a translocação limitada de metais para as partes

aéreas da planta, uma provável estratégia para diminuir danos fisiológicos e manter a função vital desses órgãos.

Souza *et al.* (2019) avaliaram a presença de nanopartículas de TiO₂ (TiO₂-NPs) medindo a concentração de Ti na Baía de Vitória-ES na água e sedimento e em órgãos do peixe *Centropomus parallelus*. Foi analisada a estrutura nanocristalográfica de TiO₂-NPs, incluindo o estado de oxidação nos órgãos/tecidos/células do peixe. Foi observada a absorção e distribuição de TiO₂ – tanto no núcleo quanto no citoplasma das células do músculo branco, rins, gônadas, hepatopâncreas e brânquias. As TiO₂-NPs tinham como origem o MPASe e a comprovação ocorreu pelo padrão nanocristalográfico semelhante encontrado tanto no pó quanto nos tecidos dos peixes.

Os resultados das análises das teias alimentares feito por Souza *et al.* (2021b) nos manguezais de Santa Cruz e na Baía de Vitória, mostraram que ocorreu transferência de metais e metaloides entre esses componentes biológicos (plantas > crustáceos > peixes / plâncton > moluscos/ plâncton > crustáceos>peixes), evidenciando a biomagnificação dos contaminantes metálicos provenientes do MPASe. Os resultados desse estudo reforçam a necessidade de regulamentações mais rígidas sobre a emissão de MPASe para proteção dos ecossistemas.

Ao longo das publicações os autores citam a necessidade de atender as demandas legislativas sobre a regulamentação e controle de emissões do MPASe no intuito de preservar a biota aquática e terrestre e assegurar a qualidade ambiental. Entretanto, as publicações se concentram em estudos de peixes teleósteos, espécies vegetais, fitoplâncton, zooplâncton, invertebrados como: camarões, caranguejos e ostras, evidenciando a ausência de estudos em anfíbios, particularmente na fase larval. Investigar os efeitos do MPASe nos anfíbios larvais possibilita uma análise mais abrangente incorporando biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade, fisiológicos e de estresse oxidativo, tais resultados permitem uma compreensão mais detalhada dos riscos ambientais, subsidiando o desenvolvimento de políticas ambientais mais eficazes.

1.3 Biomarcadores de Genotoxicidade e Mutagenicidade

Biomarcadores são indicadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos que evidenciam alterações em subsistemas de um organismo, são amplamente utilizados para detectar processos de sensibilização ou toxicidade decorrentes de condições ambientais adversas (Silva *et al.*, 2004; Vidotti e Rollemberg, 2004). A avaliação de biomarcadores

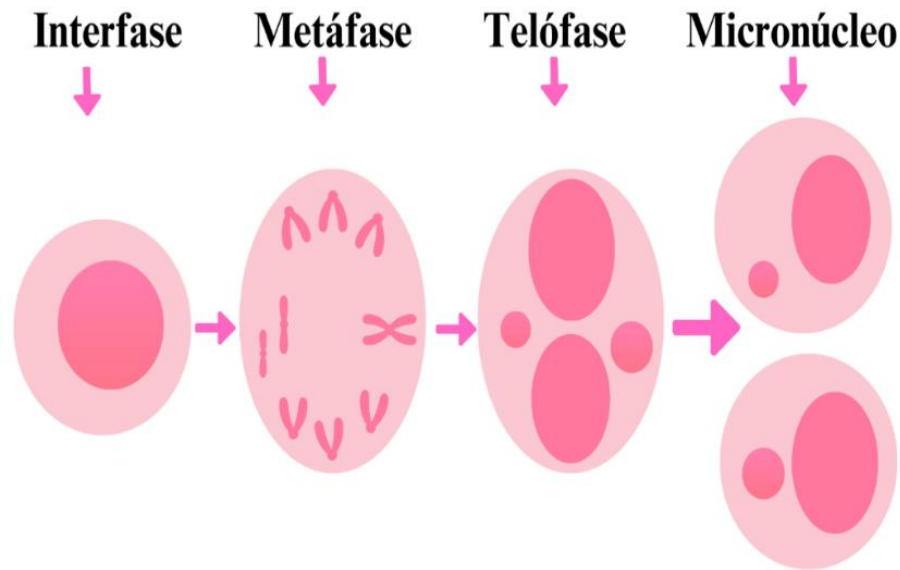
permite identificar alterações decorrentes da exposição a compostos químicos orgânicos, ou inorgânicos (Valente *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2012).

O uso de biomarcadores fundamenta-se no princípio de que xenobióticos presentes no ambiente desencadeiam, inicialmente, alterações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas ou estruturais nos organismos expostos (De Oliveira e De Souza, 2006; Schuijt *et al.*, 2021; Valente *et al.*, 2017). Ao empregar os biomarcadores, torna-se possível uma análise detalhada do organismo após a exposição a poluentes, fornecendo dados e informações que possam avaliar os riscos e efeitos associados em níveis subletais.

Os efeitos dos poluentes são consideráveis, entre os quais se destacam o potencial carcinogênico (Tabrez *et al.*, 2011), alterações na divisão celular, modificações na formação nuclear, entre outras (Josende *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2016; Veronez *et al.*, 2016). Adicionalmente, a ocorrência de perdas cromossômicas que levam ao dano mutagênico, caso não sejam reparadas, conseqüentemente, a criação de células com micronúcleos (Carrasco, Tilbury e Myers, 1990; Hooftman e Raat, 1982).

Assim, os biomarcadores de mutagenicidade e genotoxicidade são fundamentais para detectar danos no DNA e alterações celulares que podem indicar riscos para a saúde animal e o ambiental (Alimba *et al.*, 2018; Gyori *et al.*, 2014; Patar *et al.*, 2016). Entre os métodos mais adotados estão os testes de micronúcleos (MN), ilustrado na Figura 5 e de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) e também o teste cometa (Colin *et al.*, 2016; Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Borges *et al.*, 2019). Os resultados podem indicar a existência de danos no DNA, por meio de frações fragmentadas que não foram agrupados ao núcleo durante a divisão celular (Fenech, 1993; Josende *et al.*, 2015).

Figura 5- Micronúcleos formados por cromossomos atrasados e fragmentos acêntricos.

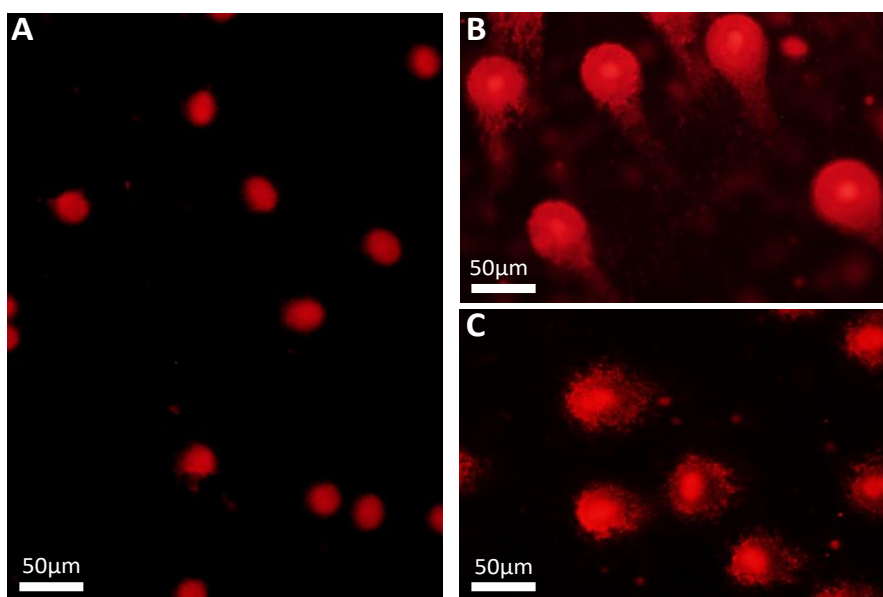


Fonte: Adaptado de Fenech (1993)

O teste cometa é uma técnica eficiente e sensível para analisar danos, oxidação e quebras nas fitas de DNA das células eucarióticas (Braafladt, Reipa e Atha, 2016; Gyori *et al.*, 2014; Patar *et al.*, 2016; Tice *et al.*, 2000). Nesse teste, os nucleoides são submetidos à técnica de eletroforese, na qual parte do material degradado se desloca ao longo da corrente elétrica.

A quantidade de material que migra na direção da corrente elétrica é denominada “cauda do cometa” e representa parte da fita de DNA que sofreu danos genéticos, a região nuclear dá origem à cabeça do cometa (Gyori *et al.*, 2014). O DNA tem carga negativa (Wang e Yang, 2017) e, quando danificado, migra para fora do núcleo, adquirindo a aparência de um cometa com cauda, cujo comprimento e intensidade são proporcionais à magnitude dos danos (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). De acordo com Gyori *et al.* (2014), a utilização de parâmetros objetivos para avaliar os danos genotóxicos (Figura 6) é fundamental para reduzir a subjetividade dos resultados do ensaio.

Figura 6- Teste cometa nucleoides sem danos (A) com danos (B e C).



Fonte: a autora

Assim, o teste de micronúcleo, o teste de anormalidades eritrocitárias e o teste cometa, são análises cujos resultados se complementam (Patar *et al.*, 2016). A aplicação conjunta dessas técnicas permite uma avaliação mais completa dos riscos genotóxicos causados dos poluentes, o que pode contribuir para a formulação de estratégias destinadas para o monitoramento e controle desses agentes.

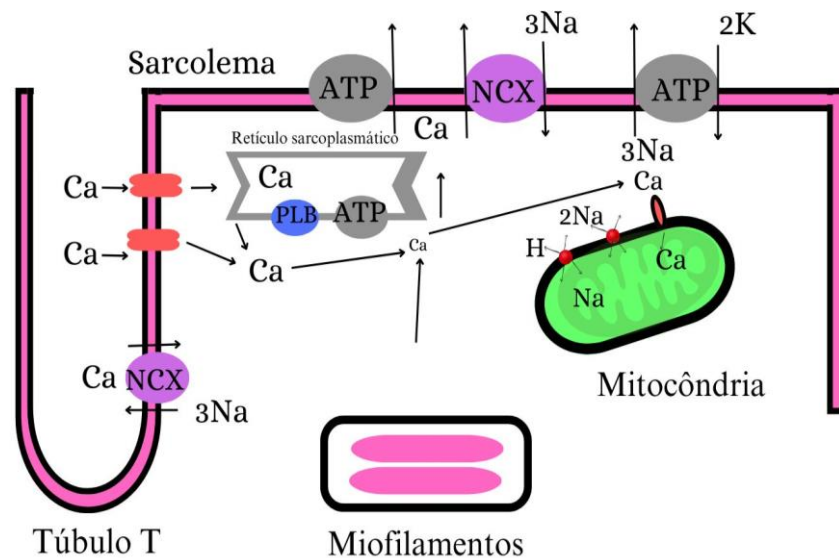
1.4 Biomarcadores fisiológicos

O funcionamento do músculo cardíaco requer atividade elétrica coordenada, rítmica e ação contrátil (Hirt, Hansen e Eschenhagen, 2014; Orchard e Brette, 2007). A capacidade desse músculo de manter seu desempenho em diferentes condições metabólicas é essencial para a sobrevivência dos organismos em situações adversas e ambientes adversos (Kluthe, 2012; Tota *et al.*, 2011). Um exemplo disso são os ajustes realizados no débito cardíaco de vertebrados ectotérmicos em resposta à exposição a contaminantes (Adorno, 2021; Shizukuda e Rosing, 2019).

A quantidade de sangue que o coração bombeia em minuto (débito cardíaco), depende da frequência cardíaca, contratilidade, pré e pós-carga (Vicent, 2008). O débito cardíaco é o produto da frequência cardíaca e do volume sistólico (Shiels e White, 2008; Tibbits *et al.*, 1992). De acordo com Bers (2001, 2002), a modulação do volume sistólico é realizada pela entrada e saída de cálcio (Ca^{2+}) no músculo cardíaco, que ocorre por meio do acoplamento excitação-contração (E-C).

O acoplamento (E-C) corresponde a uma série de eventos (Figura 7) incluindo a despolarização da membrana do miócito, a contração e o relaxamento muscular (Bers, 2002; Rissoli, 2012). Em vertebrados como os anfíbios o acoplamento E-C tem início com o potencial de ação cardíaco que despolariza a sarcolema promovendo a abertura dos canais de Ca^{2+} tipo L (LTCCs) resultando no influxo do íon (Brum, Rios e Stefani, 1988). Adicionalmente, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), atuando em seu modo reverso, também contribuiu para o influxo de Ca^{2+} durante a despolarização, porém com menor participação comparado aos LTCCs (Cifuentes, Vergara e Hidalgo, 2000).

Figura 7- Acoplamento excitação-contração de mamífero



Fonte: Adaptado de Bers (2002)

Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco de mamíferos. Setas representam as vias de entrada e saída de Ca^{2+} na sarcolema. NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; fosfolambano (PLB)

Para que ocorra o relaxamento cardíaco, o Ca^{2+} deve ser removido do citosol, diminuindo sua concentração intracelular, até atingir os níveis diastólicos (Bers 2001; Tibbits *et al.*, 1992). Quatro processos de transporte podem estar envolvidos nesse mecanismo de remoção: (i) para dentro do retículo sarcoplasmático (RS) pela bomba Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA), (ii) para fora da célula pela bomba sarcolemal Ca^{2+} -ATPase e (iii) pelo trocador de NCX sarcolemal; ou (iv) captação pela mitocôndria através do uniportador de Ca^{2+} (Yang *et al.*, 2014; Bers 2001, 2002).

Em vertebrados ectotérmicos, como os anfíbios, cuja temperatura corporal é influenciada pelo ambiente (Storer *et al.*, 2003), a presença de um RS rudimentar (não funcional), além da ausência de túbulos transversos, sugere que o efluxo de Ca^{2+} , necessário

para ocorrer o relaxamento muscular, ocorra predominantemente via sarcolema, pelo trocador NCX (Fabiato e Fabiato, 1978; Rissoli, 2012; Salla 2017).

Em anfíbios, o coração e os demais órgãos estão sujeitos a uma maior amplitude de variações nas concentrações de gases, no equilíbrio iônico e na temperatura, quando comparados aos vertebrados endotérmicos (Szeligowski *et al.*, 2022; Tota *et al.*, 2011).

O coração dos girinos se assemelha ao dos peixes, possuindo um átrio e um ventrículo, composto por tecido cardíaco trabeculado. Ele recebe exclusivamente sangue não oxigenado que é bombeado diretamente para as brânquias (Mercola, Guzzo e Foley, 2010; Storer *et al.*, 2003). Com a metamorfose, o coração passa a ter três câmaras, constituídas por um ventrículo cônico de paredes espessas, dois átrios (direito e esquerdo), um seio venoso dorsal, e um forte cone arterial tubular (Storer *et al.*, 2003). O átrio esquerdo recebe sangue oxigenado dos pulmões, enquanto o átrio direito recebe sangue venoso proveniente da circulação sistêmica (Burggren, Farrell e Lillywhite, 2011). Embora o ventrículo não possua uma divisão física, ocorre a separação funcional do sangue, o que minimiza a mistura entre o sangue oxigenado e o sangue com baixo teor de oxigênio (Schmidt-Nielsen, 1976).

Apesar da ampla utilização dos anfíbios em pesquisas ecotoxicológicas (Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2017; Motta *et al.*, 2020; Veronez *et al.*, 2016), os estudos específicos à avaliação da função cardíaca ainda são bastante limitados (Costa *et al.*, 2008; Dal-Médico *et al.*, 2014; Rissoli, 2012; Salla, 2017). As informações disponíveis sobre os efeitos da exposição ao MPASe na função cardíaca de anfíbios são inexistentes, assim como os resultados relacionados aos impactos dessa mistura multimetálica no acoplamento E-C.

Nesse contexto, uma análise *ex vivo* permite investigar a capacidade contrátil do ventrículo cardíaco frente aos desafios ambientais, como a exposição aos metais e metalóides oriundos do MPASe. O uso de parâmetros fundamentais da função cardíaca, como a força de contração, taxas de contração e relaxamento, e o índice de capacidade de bombeamento cardíaco, diretamente relacionado ao débito cardíaco do animal (Adorno, 2021; Salla 2017), possibilita uma melhor compreensão fisiológica do desempenho cardíaco. Essas informações são essenciais para compreender como a exposição a estressores ambientais pode exigir mecanismos compensatórios para garantir a sobrevivência do organismo.

1.5 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

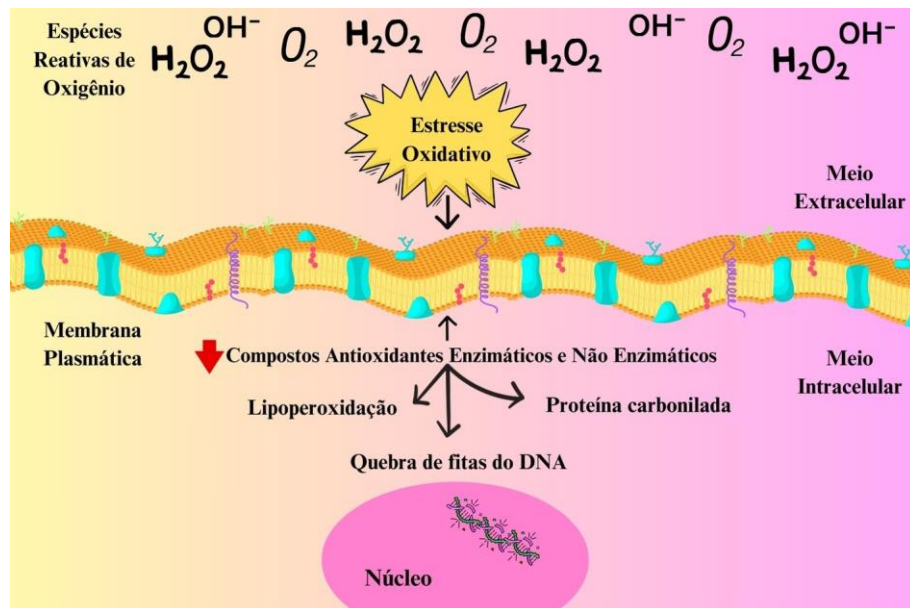
Os biomarcadores são indicadores mensuráveis de mudanças que ocorrem nos sistemas biológicos e evidenciam respostas e efeitos decorrentes da exposição a poluentes (Fernandes *et al.*, 2021; Monteiro, 2023a; Tabrez *et al.*, 2011). Dentre os tipos de biomarcadores, os bioquímicos são amplamente utilizados em estudos de monitoramento ambiental para avaliar os impactos dos poluentes, como os metais e metaloides, permitindo a compreensão dos efeitos nocivos em organismos (De Oliveira e De Souza, 2006; Monteiro *et al.*, 2023; Rechenmacher *et al.*, 2010).

A exposição dos organismos a substâncias tóxicas, pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultando em estresse oxidativo (Monteiro, 2023a; Pfaffenseller *et al.*, 2013; Schuijt *et al.*, 2021; Veronez *et al.*, 2016). O estresse oxidativo ocorre quando a produção celular de EROs excede a capacidade de defesa do sistema antioxidante em remover esses compostos (Bloomer e Goldfarb, 2004; Schuijt *et al.*, 2021).

De acordo com Halliwell (2011), o sistema antioxidante é a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo, sendo composto pelo sistema enzimático, que inclui as principais enzimas que atuam como a primeira linha do sistema de defesa, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx). Adicionalmente, o sistema de defesa não enzimático inclui moléculas como a glutatona reduzida (GSH) e também a metalotioneína (MT), cuja expressão celular está relacionada aos níveis de metais (Fernandes *et al.*, 2021; Carvalho *et al.*, 2017; Maraschi *et al.*, 2024). O sistema de defesa enzimático e o não enzimático atuam conjuntamente na proteção celular (Jain *et al.*, 2016 e Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020).

Em situações de desequilíbrio redox, a eficiência do sistema antioxidante pode ser comprometida, resultando na formação de produtos tóxicos e danos oxidativos em lipídios da membrana celular, nas proteínas e no DNA, na inativação de enzimas (Figura 8) e, em casos extremos, na morte celular (Monteiro, 2023a; Sadiq *et al.*, 2016). A utilização de biomarcadores de estresse oxidativo, como os níveis de lipoperoxidação (LPO), proteína carbonilada (PC), quebra de fitas do material genético (DNA-SB), GSH, e Capacidade Antioxidante Total (ACAP) permitem a realização de uma abordagem mais detalhada de avaliação dos efeitos adversos dos metais e metaloides que compõem o MPASe em vertebrados, especialmente no coração de girinos.

Figura 8- Esquema simplificado da produção de espécies reativas (EROs), diminuição dos compostos antioxidantes, estresse oxidativo e danos celulares.



Fonte: Adaptado de Agarwal, Prabakaran e Said (2005); Silva, Figueiredo e Rodrigues (2011).

A análise de LPO é utilizada para identificar danos na membrana celular, resultantes da oxidação de lipídios (Jiang *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 2024). A PC permite quantificar o dano oxidativo por meio da formação de carbonilas em proteínas (Lushchak, 2011). A análise de *DNA- Strand Break* (DNA-SB) é indicadora de danos que afetam a integridade do material genético (Olive, 1988). A GSH desempenha um papel essencial como antioxidante e regulador do equilíbrio redox, ao proteger os constituintes celulares da oxidação e auxiliando na remoção de xenobióticos (Huber, Almeida e Fátima, 2008; Wilhelm Filho, 1996). As respostas antioxidantes podem ser caracterizadas através da medição da Capacidade Antioxidante Total (ACAP), que mede a capacidade de neutralizar radicais peróxido gerados pela exposição a contaminantes de forma integrada (Amado *et al.*, 2009).

1.6 Anfíbios

A maioria dos anfíbios é aquática ou semiaquática, a postura dos ovos é realizada na água e as larvas respiram por brânquias, enquanto que nos adultos, a respiração ocorre por meio de pulmões e através da pele (Schmidt-Nielsen, 1976; Storer *et al.*, 2003). Os anfíbios são conhecidos por terem um “ciclo de vida complexo”, isto é, iniciam o ciclo de vida no ambiente aquático, como girinos (larvas), e sofrem metamorfose para tornarem-se adultos e viver em ambiente terrestre (Veronez, 2013). Esse grupo de animais apresenta pele úmida, razoavelmente

permeável à água e altamente vascularizada (Storer *et al.*, 2003), além de ser pobre em queratina, o que faz com que apresentem baixa capacidade de defesa contra a desidratação (Schmidt-Nielsen, 1976).

Anfíbios são classificados em três ordens: Ápoda, Urodelo e Anura (Storer *et al.*, 2003). Os Ápodas (Gymnophiones) são animais sem patas, com corpo alongado e cilíndrico, como por exemplo a cobra-cega. A segunda ordem é a Urodelo (caudados), composta por animais com quatro patas e corpo dotado de cauda, por exemplo, a salamandra. A última ordem é a Anura, cujo os animais apresentam quatro patas e ausência de cauda, por exemplo: as rãs e sapos (Boschilia, 2010; Storer *et al.*, 2003; Wake e Koo, 2018).

Os anfíbios são grupos de animais vertebrados sensíveis e vulneráveis à presença de contaminantes ambientais, tanto de origem natural como os de origem antrópica, devido à sua baixa mobilidade, ao estágio larval, que inclui períodos de suas vidas em ecossistemas aquáticos e terrestres, e à pele permeável (Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2021; Rissoli, 2012; Wake e Koo, 2018).

A comunidade científica, em meados de 1990, por meio de análise de dados identificou um evento alarmante: o declínio da biodiversidade de anfíbios (Luedtke *et al.*, 2023). Assim, surgiram inúmeras discussões sobre quais seriam as causas, com consenso de que as alterações provocadas são evidenciadas no antropoceno, provocando impactos nas populações de anfíbios (Alroy, 2015; Peluso *et al.*, 2023). Dentre as causas, destaca-se a contaminação aquática por fontes difusas de poluição, além da poluição do solo e das alterações nas paisagens naturais (Benvindo-Souza *et al.*, 2020). Essas ações combinadas provocam efeitos negativos na biologia desses animais, como malformações e alterações nos hábitos alimentares e comportamentais (Alimba *et al.*, 2018; Szeligowski *et al.*, 2022).

Os anfíbios ocupam posições relevantes nas redes tróficas aquáticas e terrestres, conectando ecossistemas por meio da metamorfose, realizando a transferência de energia e matéria da água para o ambiente terrestre. Durante a fase larval, os girinos alimentam-se de algas e de microrganismos em suspensão, além disso, partículas são capturadas por mecanismos de filtragem (Storer *et al.*, 2003). Adicionalmente, os girinos são presas servindo como fonte de alimento para peixes e aves associadas aos ecossistemas aquáticos (Cotéz-Gómez *et al.*, 2015).

Na fase adulta, os anfíbios, são importantes insetívoros, consumindo invertebrados e contribuindo com o controle populacional (Alimba *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2021; Storer *et al.*, 2003). Além disso, eles auxiliam no ciclo de nutrientes entre a água doce e os

ambientes terrestres, pois os nutrientes dos lagos, ao serem incorporados em suas larvas, são transportados para a terra por meio da dispersão e morte dos indivíduos metamorfoseados (Storer *et al.*, 2003). Em conjunto, essas características tornam esses animais espécies-chaves, promovendo o fluxo de energia e a conexão entre os habitats (Luedtke *et al.*, 2023).

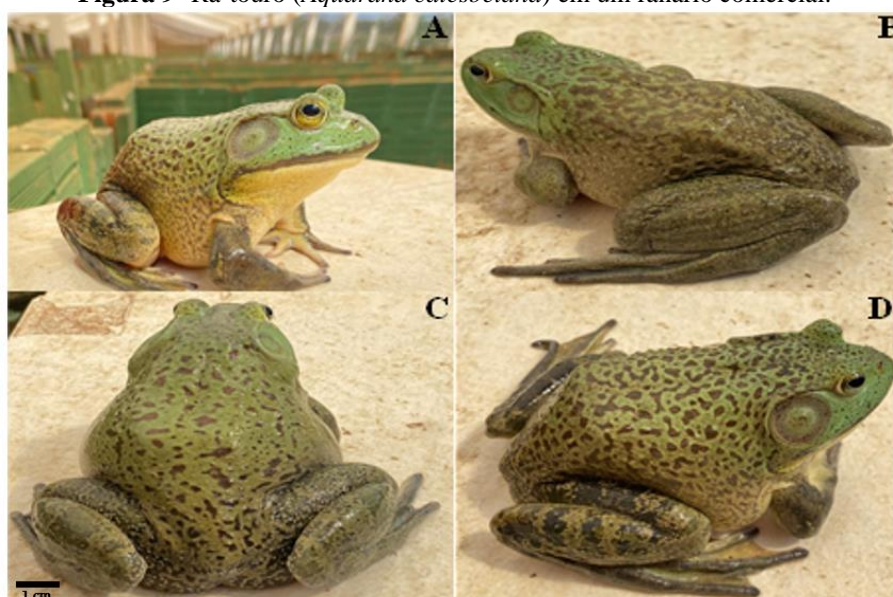
1.7 Considerações sobre a espécie *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802)

A rã-touro (*Aquarana catesbeiana* Shaw, 1802) é originária dos Estados Unidos, no entanto, essa espécie foi introduzida em países da América do Sul, incluindo o Brasil, onde atualmente se adaptou a uma variedade de ambientes (Frost, 2024). Trata-se de um táxon que representa preocupação para a biologia e conservação das espécies endêmicas de vertebrados e invertebrados, uma vez que rã-touro apresenta grande tamanho, reprodução profícua e amplo nicho ecológico, fatores que podem prejudicar as espécies nativas (Akmentins e Cardozo, 2010).

A espécie *A. catesbeiana* foi introduzida com fins comerciais no Brasil em 1935 pelo técnico canadense Tom Cyril Harriso, que trouxe da América do Norte 300 casais de rã-touro, dando início à primeira atividade comercial de ranicultura no Brasil e implantando o Ranário Aurora, no Rio de Janeiro (Seixas Filho, Pereira e Melo, 2017).

As características registradas por meio de observações diretas realizadas em campo mostram que a rã-touro adulta (Figura 9), apresenta ausência de cauda e simetria bilateral. A morfologia é robusta, com membros posteriores adaptados para a locomoção por salto. A coloração predominante é esverdeada, os olhos são proeminentes, com córneas de formato elipsoide, circundadas por uma linha branca bem definida que demarca o contorno ocular. Em espécimes que habitam áreas predominantemente sombreadas, observa-se uma uniformidade da cor desde a cabeça até o dorso, com predomínio da coloração marrom escura.

Figura 9- Rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) em um ranário comercial.



Fonte: a autora

A distribuição geográfica dessa espécie invasora é bastante ampla no território brasileiro, adaptando-se a diferentes ecossistemas e ambientes, sua capacidade de reprodução é constante independente do período do ano. A postura de ovos atinge números entre centenas e até milhares, a dieta da espécie abrange uma ampla diversidade de presas, caracterizando-a como generalista, o que inclui cerca de 600 espécies de animais aquáticos ou terrestres e até mesmo aves (Cunha e Delariva, 2009).

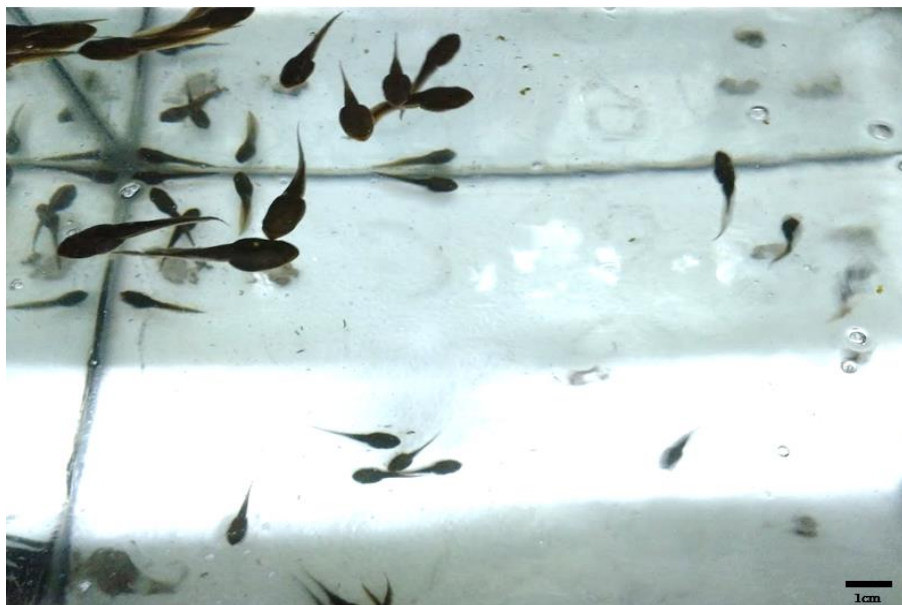
De acordo com Chagas *et al.* (2020), os girinos de rã-touro (Figura 10) apresentam maior sensibilidade em comparação aos animais adultos, principalmente nas fases iniciais de sua vida. O ciclo de vida é dividido em duas principais fases: a fase larval, que ocorre exclusivamente no ambiente aquático e abrange a fecundação, a postura e a eclosão dos ovos, além do desenvolvimento de estruturas como uma cauda e brânquias (Gosner, 1960). Esse processo é dividido em 47 diferentes estágios, como o estágio 25, no qual ocorre transição da estrutura branquial de externa para interna ao corpo (Gosner, 1960).

O estágio 25 é frequentemente utilizado em pesquisas devido à sua importância no desenvolvimento embrionário. Esse estágio representa um ponto crítico na transição das formas embrionárias para as larvais, além de servir como um ponto padronizado entre diferentes espécies, o que facilita estudos comparativos (Do Amaral *et al.*, 2022; Veronez *et al.*, 2016).

Na segunda fase é marcada pela transição para o ambiente terrestre, onde os girinos completam o seu desenvolvimento passando por metamorfose (Storer *et al.*, 2003). Deste

modo, perdem a cauda e as brânquias e desenvolvem os membros anteriores e posteriores adaptados para o deslocamento, salto, nado e um pulmão primitivo, preparados para viver no ambiente terrestre (Gosner, 1960). O tempo da evolução da metamorfose até a fase adulta pode durar entre 3-4 meses mudando de acordo com alterações na temperatura da água (Cunha e Delariva, 2009).

Figura 10- Girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) em tanque de experimentação.



Fonte: a autora

Estudos utilizando essa espécie podem, em certa medida, ser considerados uma forma de suporte à proteção de espécies endêmicas no Brasil. Desse modo, o emprego de uma espécie exótica em experimentos é uma medida de preservação das espécies nativas, além de serem cultivadas em ambientes artificiais como os ranários, o que as tornam facilmente encontradas.

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, a atual classificação de rã-touro é:

Reino: **ANIMALIA**

Filo: **CHORDATA**

Subfilo: **VERTEBRATA**

Classe: **AMPHIBIA**

Ordem: **ANURA**

Família: **RANIDAE**

Gênero: *Aquarana*

Espécie: *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802)

Nome popular: rã-touro, rã-touro gigante

1.8 Justificativa

Esta pesquisa pode fornecer subsídios para a implementação de políticas públicas ambientais mais eficazes e com maiores critérios para proteger a biodiversidade e os ecossistemas aquáticos. É fundamental compreender os efeitos que o MPASe pode causar em espécies de animais que habitam ambientes aquáticos e que são consideradas sensíveis à exposição a contaminantes, especialmente os anfíbios, que durante o estágio larval habitam de forma restrita esses ecossistemas.

Os resultados sobre os impactos da exposição ao MPASe poderão fornecer uma compreensão mais abrangente dos efeitos da poluição atmosférica proveniente da atividade metalúrgica sobre os anfíbios. A análise das células sanguíneas fornece dados relevantes sobre fatores de estresse e o estado geral de saúde, enquanto as avaliações genotóxicas e mutagênicas elucidam os danos ao DNA e a ocorrência de mutação induzidas pela exposição ao MPASe. Adicionalmente, os resultados das análises fisiológicas cardíacas permitirão identificar os ajustes no débito cardíaco e as compensações fisiológicas realizadas para contornar os danos ocasionado pela exposição. A análise dos biomarcadores de estresse oxidativo evidenciará a atuação dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático.

Trata-se de um estudo detalhado de grande importância, cujas as informações poderiam contribuir como subsídios para a tomada de decisão de gestores ambientais em diversas instâncias, inclusive a conservação dos recursos hídricos. Além disso, os resultados podem auxiliar os tomadores de decisão na elaboração de políticas de mais criteriosas sobre o limite de lançamento diário de MPASe na atmosfera, sobretudo no que tange a contaminação da água por sedimentação de partículas atmosféricas.

1.9 Hipótese

- Hipótese nula: Os metais e metaloides presentes no MPASe não bioacumulam em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), não provoca danos genotóxicos e mutagênicos, não altera o sistema antioxidante, e a função cardíaca dos girinos, após a exposição de 96 horas.
- Hipótese alternativa: Os metais e metaloides presentes no MPASe bioacumulam em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), provoca danos genotóxicos e mutagênicos, altera o sistema

antioxidante, e a função cardíaca dos girinos, com efeitos mais severos devido às particularidades anatômicas e fisiológicas, bem como as diferenças na funcionalidade dos canais envolvidos na contratilidade cardíaca após a exposição de 96 horas.

1.10 Objetivo geral

Determinar a bioconcentração de metais e metaloides, os efeitos genotóxicos e mutagênicos, além das alterações fisiológicas cardíacas e sobre biomarcadores bioquímicos no sangue e no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) expostos a uma concentração subletal e ambientalmente relevante de MPASe (1g/L⁻¹/ 96 h).

1.10.1 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, uma série de análises foram realizadas, as quais estão divididas em tópicos, constituindo assim os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar e quantificar a concentração de metais e metaloides oriundos do MPASe, bem como os metais presentes na água, no sangue e no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*);
2. Avaliar a bioconcentração de metais e metaloides no sangue e no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), evidenciando a possibilidade de transferência e acúmulo dos metais oriundos do MPASe;
3. Investigar os efeitos da exposição ao MPASe nos girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), na saúde e bem-estar do animal, quantificando o índice hepatossomático (IHS), o fator de condição (K), e a massa ventricular relativa (MVR);
4. Determinar o conteúdo de hemoglobina (Hb) no sangue de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*);
5. Verificar se a exposição ao MPASe induziu efeitos mutagênicos nos eritrócitos de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*);
6. Avaliar a indução de danos genotóxicos nos eritrócitos de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) decorrentes da exposição ao MPASe;
7. Quantificar as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) para identificar possíveis respostas de estresse nos diferentes grupos celulares decorrentes da exposição ao MPASe;
8. Analisar a frequência cardíaca (*fH*) *in loco* de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*);
9. Avaliar os efeitos da exposição ao MPASe (1g/L⁻¹ 96h) na contratilidade no ventrículo isolado de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*);

10. Analisar os biomarcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), incluindo glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), os níveis de lipoperoxidação (LPO), de proteínas carboniladas (PC), de quebra de fita de (DNA DNA-SB), e capacidade antioxidante total (ACAP).

2. CAPÍTULO II

EFEITOS TÓXICOS, GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E BIOACUMULATIVOS PROVOCADOS POR EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL (MPAS_e) EM GIRINOS DE RÃ-TOURO

Aquarana catesbeiana (SHAW, 1802) ²

² Publicado em: COSTA, R. L. *et al.* Toxic, genotoxic, mutagenic, and bioaccumulative effects of metal mixture from settleable particulate matter on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 340, p. 122846, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122846>.

2.1 Apresentação

Esse capítulo detalha os efeitos do MPASe no sangue de girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner, expostos a 1g/L^{-1} de MPASe durante 96 horas, utilizando análises representativas que avaliaram os efeitos mutagênicos, genotóxicos e indicadores de saúde animal. Os resultados indicam que, mesmo em uma concentração subletal, o MPASe desencadeia alterações nas taxas de crescimento, na condição física, danos genotóxicos e efeitos mutagênicos nos eritrócitos, evidenciando a necessidade de padrões regulatórios para o MPASe, afim de proteger o ambiente e os anfíbios.

2.2.1 Materiais e Métodos

2.2.2 Área de coleta

O MPASe foi coletado na Ilha do Boi ($20^{\circ}17'S$ e $40^{\circ}14'W$), na cidade de Vitória (Espírito Santo, Brasil), localizada a 14 km do Complexo de Tubarão, uma das mais importantes regiões brasileiras de atividade siderúrgica. De acordo com Santos *et al.* (2017), essa área é diretamente afetada pelos impactos decorrentes das atividades metalúrgicas, como a pelletização, a indústria de aço e mineração de ferro que ocorre há mais de 50 anos (Figura 11 e 12).

Figura 11- Localização do Complexo do Tubarão e da Ilha do Boi, Vitória - ES



Localização do Complexo do Tubarão e do ponto de coleta das amostras de MPASe na Ilha do Boi, Vitória, Espírito Santo - ES, Brasil. **Fonte:** a autora (2024)

A Ilha do Boi recebe impacto direto do material particulado liberado pelo Complexo de Tubarão (deposição de MPASe $> 10\text{g/m}^2/30$ dias, entre setembro e março (IEMA, 2021;

Santos *et al.*, 2017), ao mesmo tempo em que apresenta baixa contaminação atmosférica por fontes móveis, como o tráfego rodoviário (Souza *et al.*, 2021a).

Figura 12- Atividades metalúrgicas do Complexo do Tubarão e da Ilha do Boi, Vitória - ES.



Fonte: a autora (2025)

A amostragem do MPASe foi realizada pela organização não governamental JUNTOS SOS Ambiental em outubro de 2020, utilizando contêineres no telhado a cerca de 20 m do solo, sendo coletada durante 30 dias consecutivos ($18 \text{ g/m}^2/\text{mês}$ em uma área de 5.000 m^2) conforme descrito (Souza *et al.*, 2021a).

No Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), as amostras foram peneiradas em malha de poliéster de 2 mm para remoção de materiais inertes (pedaços de papel, galhos, folhas, rochas, etc.) e para dispersão de eventuais agregados, conforme descrito por Adorno *et al.* (2023). Todas as amostras foram identificadas e armazenadas em temperatura ambiente e em local seco até o uso.

2.2.3 Cuidados com animais e exposição ao MPASe

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar (CEUA), conforme o protocolo nº 4046210222. Os girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner (Gosner, 1960) foram adquiridos em um ranário comercial no município de Matão, Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil ($21^{\circ}65'S$ e $48^{\circ}38'W$) no mês de abril de 2022.

Posteriormente, os girinos foram aclimatados em tanques de 500 L equipados com fornecimento contínuo de água bem aerada e desclorada, em temperatura constante ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo natural (~12 h ciclo claro: escuro) por cerca de 10 dias. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial em flocos (32% de proteína), que foi retida 24 horas antes da exposição.

Os girinos foram transferidos aleatoriamente para aquários de 180 L e permaneceram por 2 dias antes do experimento, para a recuperação do estresse da transferência e aclimação. Os girinos foram divididos em grupos experimentais: o grupo controle (Ct; n = 12), exposto à água livre de MPASe e o grupo exposto por 96 horas à concentração subletal e ambientalmente relevante de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de MPASe (MPASe; n = 12).

A exposição foi realizada em duplicata (duas caixas com 12 girinos em cada uma) em condições estáticas de acordo com os padrões estabelecidos pela American Society for Testing and Materials (ASTM, 2000). Nas condições experimentais, a concentração de MPASe escolhida representa a taxa de deposição atmosférica de PM ($> 10 \text{ g/m}^2/30$ dias) que ocorre frequentemente durante a estação chuvosa na Região Metropolitana de Vitória (Santos *et al.*, 2017). A composição metálica do MPASe foi identificada e medida usando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Souza *et al.*, 2021a) que apresentou altas concentrações dos seguintes metais: $\text{Fe56} > \text{Ti} > \text{Ba} > \text{Al} > \text{Pb} \cong \text{Sr} > \text{Ce} > \text{Zr} > \text{La} > \text{Mn} > \text{Y} > \text{Rb} > \text{Zn} > \text{As} > \text{Sn} > \text{Mo} \cong \text{Nb} > \text{Se} > \text{W} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{V} > \text{Ag}$.

Durante o período de aclimação e exposição, os parâmetros físicos e químicos foram mantidos quase constantes: temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ que foi medida usando um termômetro, pH 6,7 - 7,5, oxigênio dissolvido 6,5 - 7,8 mg/L, dureza 50 - 65 mg/L (como CaCO_3), condutividade 68 - 104 $\mu\text{S/cm}$ e concentrações de amônia permaneceram em abaixo de 1 mg/L.

Durante a exposição, o comportamento dos animais foi observado regularmente e devidamente registrado, pontuando alterações quanto ao desempenho natatório, letargia, sinais de estresse, ao longo de quatro intervalos diários distintos. Ao final do período experimental, os girinos foram anestesiados com benzocaína a 0,1% e as amostras de sangue foram retiradas utilizando a punção cardíaca com seringas heparinizadas para procedimentos hematológicos.

Posteriormente, os animais foram eutanasiados com overdose de benzocaína a 0,5% de acordo com as recomendações da American Veterinary Medical Association (AVMA, 2001). O peso corporal, o comprimento total e peso do fígado foram obtidos. Esses dados

biométricos foram utilizados para calcular o fator de condição [$FC = 100 \times \text{peso corporal} / (\text{comprimento total})^3$] e índice hepatossomático ($HSI = 100 \times \text{peso do fígado} / \text{peso corporal}$) como dados indiretos de biomarcadores fisiológicos do estado de saúde (Hegde e Krishnamurthy, 2014).

2.2.4 Determinação de metais e metaloides

As amostras de água foram acidificadas pela adição de 2% de ácido nítrico (grau sub-ebulição) e filtradas através de filtro de nitrocelulose de 0,45 μm , de acordo com as diretrizes ICP-MS da Agilent, para determinação de elementos dissolvidos. O MPASe e as amostras de sangue (0,1 g de peso seco) foram submetidas a digestão com 3 mL de ácido nítrico (grau sub-ebulição), 750 μL de ácido clorídrico (grau sub-ebulição) e 250 μL de peróxido de hidrogênio por 24 horas mantidos a 100 °C para determinação das concentrações totais de metais e metaloides. Todas as amostras foram armazenadas em ambiente limpo a 4°C até análise posterior.

A análise química seguiu os procedimentos descritos por Monferrán *et al.*, (2016) com pequenos ajustes (Souza *et al.*, 2021a). Água ultrapura foi obtida (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$; $\leq 5 \mu\text{g.L}^{-1}$ TOC) do sistema de purificação Arium 61316-RO mais Arium 611 UV (Sartorius, Alemanha). Foi utilizada uma solução padrão multielementar Merck VI CertiPUR® para calibração. O ácido nítrico (69%) de grau sub-ebulição foi preparado a partir de ácido de grau analítico por meio da destilação sub-ebulição, utilizando o destilador DistilAcid. A pureza do ácido nítrico foi verificada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Agilent 7500cx, EUA), equipado com um amostrador automático ASX-100 (CETAC Technologies, Omaha, NE).

Os filtros (0,45 μm) foram obtidos da Millipore (São Paulo, Brasil). Todos os recipientes foram deixados durante a noite em solução de ácido sulfúrico/nítrico e posteriormente lavados com água ultrapura. As sondas e tubos de ICP eram de polímero politetrafluoretileno (PTFE), previamente lavados com ácido nítrico ultrapuro. Tubos de PTFE pré-limpos (Savillex) foram utilizados para os procedimentos empregados para a digestão.

Vinte e sete elementos foram medidos (Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe56, Hg202, La, Mn, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Se, Sn, Sr, Ti, V, W, Y, Zn e Zr), em triplicata usando ICP-MS conforme o método de determinação de elementos traço em águas e resíduos por espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada 200.8 (USEPA, 2009) no Instituto

de Ciência e Tecnologia de Alimentos Córdoba (ICYTAC), Argentina. O controle e a garantia de qualidade foram alcançados usando produtos certificados de material de referência (MR-Agro E3002A, julho de 2020). As recuperações de CRM foram de $89 \pm 18\%$. A repetibilidade das medições de ICP-MS foi geralmente de $\geq 96,8\%$.

Conforme descrito em Adorno *et al.* (2023), o fator de bioconcentração (FBC) foi calculado a partir das concentrações médias dos metais medidas nas amostras de sangue ($\mu\text{g.g}^{-1}$) e nas respectivas concentrações de metais na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Nos casos em que as concentrações de água metálica estavam abaixo do limite de detecção (LOD) ou no limite de quantificação (LOQ), os respectivos resultados de FBC foram calculados usando os valores de LOQ.

2.2.5 Parâmetros hematológicos

O conteúdo de hemoglobina total (Hb) foi determinado pelo método colorimétrico a 540 nm utilizando o protocolo da cianometahemoglobina com um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro UV-Vis (BEL Engineering, Itália).

A contagem total de células do sangue (CBC) foi realizada utilizando um contador automático de células (BioRad TC20 Automated Cell Counter), com alíquotas de amostras de sangue diluídas (1:66) em solução salina de tampão fosfato (PBS) em seguida 20 μL da mistura foram pipetados para as lâminas de contagem da câmara BioRad. As amostras foram contadas em réplicas, os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição para calcular a contagem final de células por mL.

2.2.6 Mutagenicidade e contagem diferencial

Para verificar a ocorrência de efeitos mutagênicos oriundos da exposição aos metais e metaloides, alíquotas de 5 μL de sangue foram imediatamente espalhadas em lâminas limpas de microscópio e secas ao ar. As lâminas de células foram preparadas em triplicata e fixadas em metanol a 100% por 10 min, e coradas com ácido periódico de schiff (PAS) antes da montagem.

As imagens foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX-61 (Olympus, PA-EUA), com ampliação de 100x, as análises foram realizadas com o *software* cellSens™ (Olympus, PA-EUA). Uma amostra de 1.000 células foi analisada por animal para determinar a frequência de diferentes tipos de células sanguíneas, micronúcleos (MN) e outras anormalidades nucleares eritrocitárias (ENAs) de acordo com as metodologias descritas em: Lajmanovich *et al.* (2005); Pollo *et al.* (2015); Shahjahan *et al.* (2020).

Para uma melhor compreensão dos efeitos da exposição da mistura metálica nas células sanguíneas, foram quantificadas, de forma concomitante, as frequências dos tipos de células, incluindo glóbulos vermelhos, leucócitos e trombócitos, bem como a contagem diferencial de cada tipo de leucócitos (monócitos, neutrófilos, linfócitos, basófilos e eosinófilos) foram quantificadas a partir das lâminas preparadas e classificados seguindo os critérios propostos por Thrall (2004).

Os critérios para identificação do MN foram: (i) o diâmetro é menor que o do núcleo principal, (ii) a intensidade de um MN corado deve ser semelhante ou inferior à do núcleo principal, e (iii) não deve ser conectado ou sobreposto ao núcleo principal (Borges *et al.*, 2019; Lajmanovich *et al.*, 2005).

Outros tipos de ENAs foram avaliadas de acordo Benvindo-Souza *et al.* (2020), Carrasco *et al.* (1990), Lajmanovich *et al.* (2005), sendo essas: núcleos entalhados (NT), núcleos em forma de rim (RM), núcleos lobados (LB), núcleos com bolhas (BL), células anucleadas (AN), células apoptóticas (AP), células binucleadas (BN), vacuoladas (VA) núcleos e núcleo picnótico (PN). Os resultados foram expressos como frequência ANEs por tipo de anormalidade e para o conjunto total de anomalias como o valor médio (%) da soma (NT + RM + LB + BL + AN + AP + BN + VA + PN) de todas as lesões observadas.

2.2.7 Genotoxicidade

O efeito de genotoxicidade do MPASe no DNA foi avaliado através da versão alcalina do teste cometa, conforme descrito por Singh *et al.* (1988) com modificações (Tice *et al.*, 2000). Para o teste cometa realizado em amostra de sangue, 500 µL de solução salina de tampão fosfato (PBS) foram adicionados a 5 µL de amostras de sangue. Em seguida, 10 µL de sangue diluído em PBS foram misturados em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75% a 37 °C).

Assim, as suspensões celulares de agarose de baixo ponto de fusão (100 µL) foram colocadas em lâminas de células de agarose de ponto de fusão normal pré-revestidas (1%), cobertas com lamínulas, mantidas sob refrigeração (10°C) por 20 min e depois as lamínulas foram removidas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução de lise (ácido etilenodiaminotetracético – EDTA 100 mM, cloreto de sódio 2,5 M, base Trizma 10 mM, Triton X-100 1%, dimetilsulfóxido 20% – DMSO, pH 10,0) por 3 horas. A eletroforese foi realizada a 25 V e 300 mA por 15 min.

As lâminas foram fixadas em etanol absoluto e coradas com solução GelRed™ (Biotium, Inc) em condições de baixa luminosidade. Imagens de 100 nucleoides por animal foram obtidas aleatoriamente no *software* cellSens™ (Olympus, PA-EUA) utilizando um microscópio fluorescente Olympus BX-61 (Olympus, PA-EUA) com câmera acoplada com ampliação de 200x e filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. As imagens foram analisadas utilizando o *software* imageJ (versão 1.3) com o *plugin* openComet© (Gyori *et al.*, 2014).

De acordo Gyori *et al.* (2014), o *plugin* openComet© acoplado ao *software* calcula os parâmetros como a área do cometa (CA = número de pixels no cometa), conteúdo de DNA da cauda (TC = soma das intensidades de pixel dentro da cauda), comprimento da cauda (TL = comprimento da cauda em pixels), DNA da cauda % (T = conteúdo de DNA da cauda como porcentagem do conteúdo de DNA do cometa), momento da cauda (TM = comprimento da cauda vezes DNA da cauda%) e momento olive da cauda (OM = produto do DNA da cauda% e a distância entre os centroides ponderados pela intensidade da cabeça e da cauda). Estes parâmetros demonstraram ser indicadores úteis dos danos subjacentes ao DNA (Bhuyan *et al.*, 2020; Collins, 2004; Olive *et al.*, 1990; Yin *et al.*, 2009).

2.2.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias \pm E.P.M. Todos os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene para examinar a homogeneidade da variância. As diferenças entre os grupos Ct e MPASe foram identificadas usando o teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney (GraphPad InStat 3.1, GraphPad Software, Inc.). As diferenças entre as médias ao nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

2.2.9 Resultados e Discussão

As concentrações de metais e metaloides no MPASe ($\mu\text{g g}^{-1}$) estão apresentadas na Tabela 1, bem como as concentrações detectadas na água após 96 horas de exposição ao MPASe, são mostradas nas Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1- Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) no MPASe (n=3) coletado na Ilha do Boi, Vitória, ES, Brasil, em outubro /2020. Os valores são média \pm E.P.M. LOD: Limite de determinação. LOQ: Limite de quantificação.

Metais e metaloides	Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) do MPASe by ICP-MS		
	Média amostral	LOD	LOQ
Fe ⁵⁶	1277,95 \pm 29,33	0,32	0,87
Ti	882,17 \pm 33,48	0,07	0,17
Ba	165,55 \pm 0,21	0,09	0,18
Al	80,08 \pm 2,32	0,32	0,87
Pb	72,00 \pm 0,25	0,04	0,10
Sr	70,17 \pm 0,66	0,01	0,04
Ce	43,95 \pm 0,16	0,005	0,010
Zr	32,60 \pm 0,52	0,06	0,12
La	20,45 \pm 0,02	0,005	0,010
Mn	12,90 \pm 0,25	0,03	0,04
Y	11,05 \pm 0,11	0,002	0,006
Rb	5,55 \pm 0,11	0,07	0,32
Zn	4,99 \pm 0,08	0,17	0,48
As	3,04 \pm 0,07	0,02	0,07
Sn	2,19 \pm 0,10	0,04	0,13
Mo	2,04 \pm 0,03	0,02	0,05
Nb	2,02 \pm 0,06	0,009	0,022
Se	1,32 \pm 0,02	0,14	0,26
W	0,92 \pm 0,01	0,02	0,06
Cu	0,81 \pm 0,02	0,01	0,04
Cd	0,74 \pm 0,04	3,10 ⁻⁵	8,10 ⁻⁵
Cr	0,61 \pm 0,02	0,02	0,06
Ni	0,50 \pm 0,01	0,02	0,03
V	0,39 \pm 0,01	0,05	0,07
Ag	0,23 \pm 0,01	0,001	0,003
Bi	< LOQ	0,07	0,20
Hg ²⁰²	< LOD	0,07	0,13

Fonte: a autora

Após quatro dias de exposição ao MPASe, foram observadas que as concentrações aumentaram significativamente em amostras de água com elevações de Al (28%), Ni (189%), Rb (31%), Sr (64%), V (56%) e Zn (322%). Além disso, foi detectada a presença de Cd, Ce, Cu, Fe⁵⁶, La, Mn, Pb e Ti, todos com valores abaixo do LOD ou LOQ nas amostras de água dos grupos controle.

Tabela 2- Concentrações de metais/metaloídeos dissolvidos ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em amostras de água ($n = 3$) dos grupos Ct e MPASe ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) colhidas ao final do experimento (96 h). Os valores são média \pm E.P.M. LOD: Limite de determinação. LOQ: Limite de quantificação.

Metais e metalóides	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na água ICP-MS			
	Ct	MPASe	LOD	LOQ
Fe ⁵⁶	< LOD	323,02 \pm 2,34	3,89	7,98
Ba	46,31 \pm 0,51	42,39 \pm 5,94	0,15	0,31
Zn	11,47 \pm 0,79	48,40 \pm 2,07*	0,17	0,48
Sr	13,61 \pm 0,83	22,40 \pm 2,87*	0,09	0,22
Al	15,95 \pm 1,22	20,40 \pm 1,71*	0,10	0,28
Pb	< LOD	8,76 \pm 0,09	0,19	0,45
Cu	< LOQ	8,70 \pm 0,13	0,45	1,09
Rb	5,11 \pm 0,23	6,70 \pm 0,24*	0,06	0,08
Mn	< LOD	5,07 \pm 0,29	0,38	0,83
Ni	0,79 \pm 0,13	2,28 \pm 0,65*	0,06	0,10
V	0,87 \pm 0,10	1,36 \pm 0,05*	0,05	0,07
Cd	< LOD	0,66 \pm 0,01	0,04	0,05
Ti	< LOD	1,20 \pm 0,17	0,02	0,05
La	< LOD	0,06 \pm 0,001	0,0003	0,0008
Ce	< LOQ	0,17 \pm 0,07	0,0007	0,0019
Ag	< LOD	< LOD	0,02	0,05
As	< LOD	< LOD	0,03	0,09
Bi	< LOD	< LOD	0,12	0,28
Cr	< LOD	< LOD	0,05	0,09
Hg ²⁰²	< LOQ	< LOQ	0,07	0,12
Mo	< LOD	< LOD	0,02	0,06
Nb	< LOD	< LOD	0,15	0,37
Se	< LOD	< LOD	0,06	0,15
Sn	< LOD	< LOD	0,07	0,18
W	< LOD	< LOD	0,008	0,021
Y	< LOD	< LOD	0,003	0,005
Zr	< LOD	< LOD	0,03	0,08

* indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Neste caso, a concentração destes seis metais foi de 13 a 89 vezes superior aos valores LOQ. Metais não essenciais (Al, Cd, Ce, La, Rb, Sr, Pb, Ti e V) são reconhecidos por não terem funções biológicas no organismo e são considerados potencialmente perigosos em formas combinadas ou elementares, mesmo em baixas concentrações (Hassine e Escorzia, 2017; Souza *et al.*, 2021b; Slobodian *et al.*, 2021). Além disso, mesmo uma exposição aguda a uma concentração ambientalmente relevante de MPASe resultou em concentração de Fe⁵⁶ acima do valor estabelecido pela legislação brasileira CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005).

Também é importante destacar a presença de contaminantes metálicos emergentes, como Ce, La, Rb, Sr, Ti e V, que não são regulamentados em termos ambientais de qualidade da água e de descargas de águas residuais. Cabe ressaltar que, atualmente existe pouca informação e compreensão sobre o potencial de toxicidade e riscos à biota aquática (Souza *et al.*, 2021b), provocados por esse tipo de contaminante.

Estudos anteriores relataram que a dissolução do MPASe em água libera metais livres e nanopartículas contribuindo para o aumento de metais na água (Adorno *et al.*, 2023; Soares *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2021a). A bioacumulação de metais e metaloides no sangue de girinos expostos ao MPASe (Tabela 3) foi demonstrada por aumentos significativos nas concentrações de Ti (1990%), Al (619%), Pb (551%), La (536%), Ce (468%), Cr (187%), Ag (89%), Rb (45%) e Fe⁵⁶ (30%) além da presença de Sn, Zn, Cu, V e As, todos abaixo dos valores LOD ou LOQ em amostras de controle de sangue.

A concentração desses cinco metais foi de 3 a 711 vezes maior que os valores de LOQ. Portanto, as concentrações totais de metais parecem ser de várias ordens de grandeza maiores que as concentrações determinadas na água. Entre esses metais, formas dissolvidas de Ag, Ce, Cr e Sn foram encontradas consistentemente baixas e/ou abaixo do LOD na água do grupo MPASe.

A bioacumulação de metais e metaloides no sangue de girinos (*A. catesbeiana*) pode resultar em efeitos sinérgicos relevantes, o Ti por exemplo, pode interagir com componentes plasmáticos, afetando inclusive os mecanismos de transporte de oxigênio (Chang *et al.*, 2020). O Al, embora não tenha uma função biológica específica, pode ser extremamente tóxico (Wilson, 2011). Danos generalizados em modelos animais estão associados à exposição ao Fe, como a necrose, a hiperplasia, e o estresse oxidativo (Souza, 2021). Adicionalmente o La, está associado a inibição e deficiência enzimática (Monteiro, 2022). Metais como o Cr possuem

capacidade de produzir radicais resultando em danos ao DNA, depleção de sulfidrilas, indicando dano oxidativo nas proteínas (Valko, Morris e Cronin, 2005).

Tabela 3- Concentração de metais/metaloídes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no sangue total ($n = 3$) de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe ($1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). LOD: Limite de determinação. LOQ: Limite de quantificação. Os valores são média \pm E.P.M.

Metais e metaloídes	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no sangue by ICP-MS			
	Ct	MPASe	LOD	LOQ
Fe ⁵⁶	1521,18 \pm 181,69	1971,18 \pm 86,83*	3,89	7,98
Al	35,73 \pm 5,53	257,07 \pm 33,17*	0,10	0,28
Sn	< LOQ	128,00 \pm 23,17	0,07	0,18
Pb	11,77 \pm 0,19	76,46 \pm 0,64*	0,19	0,45
Zn	< LOQ	69,86 \pm 5,90	0,17	0,48
Cr	22,80 \pm 7,43	63,91 \pm 9,40*	0,08	0,09
Cu	< LOD	25,56 \pm 0,30	0,45	1,09
Ti	0,39 \pm 0,22	8,11 \pm 1,21*	0,02	0,05
Rb	3,95 \pm 0,08	5,72 \pm 0,77*	0,06	0,08
V	< LOQ	3,52 \pm 0,69	0,05	0,07
Ce	0,51 \pm 0,11	2,90 \pm 0,81*	$7,10^{-4}$	0,002
La	0,22 \pm 0,05	1,38 \pm 0,46*	$3,10^{-4}$	$8,10^{-4}$
Ag	0,29 \pm 0,002	0,55 \pm 0,05*	0,02	0,05
As	< LOD	0,28 \pm 0,16	0,03	0,09
Cd	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,04	0,05
Y	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,005	0,003	0,005
Ni	0,36 \pm 0,09	0,20 \pm 0,09	0,06	0,10
Se	1,32 \pm 0,29	< LOD	0,06	0,15
Ba	< LOQ	< LOQ	0,15	0,31
Bi	< LOQ	< LOQ	0,12	0,28
Hg ²⁰²	< LOQ	< LOQ	0,07	0,12
Mn	< LOQ	< LOQ	0,38	0,83
Mo	< LOQ	< LOQ	0,02	0,06
Nb	< LOD	< LOD	0,15	0,37
Sr	< LOQ	< LOQ	0,09	0,22
W	< LOD	< LOD	0,008	0,021
Zr	< LOQ	< LOQ	0,03	0,08

* indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Os padrões de acumulação de metais e metaloides no sangue após 96 horas de exposição à mistura de metais contida no MPASe sugerem que os girinos absorveram metais dissolvidos e, pelo menos em parte, nanopartículas metálicas. Nesse cenário, o estudo desenvolvido anteriormente em nosso laboratório demonstrou que nanopartículas metálicas contidas no MPASe podem ser internalizadas e distribuídas para órgãos de peixes, como o coração (Adorno *et al.*, 2023).

Considerando o exposto, metais dissolvidos são classicamente definidos como aqueles que passam através de um filtro de 0,45 μm e são mais imperativos para toxicidade do que as formas totais, que incluem metais ligados a compostos de água e/ou nanopartículas que estão menos disponíveis para serem absorvidos por animais (Anzecc e Armcanz, 2000; USEPA, 1996). Além disso, também é necessário considerar a sedimentação/complexação de metais com outros materiais particulados que os tornam indisponíveis na coluna d'água, mas podem ser incorporados através da ingestão de sedimentos. Consequentemente, a bioacumulação é afetada pelas taxas de absorção, metabolismo e eliminação, bem como pela capacidade de armazenamento de um organismo (Herrmann *et al.*, 2016).

Cabe ressaltar que, os girinos são particularmente suscetíveis à acumulação de metais em relação aos adultos terrestres, pois podem absorver metais diretamente por absorção através das brânquias e da pele e através da ingestão de sedimentos (Guezgouz *et al.*, 2021; Milani *et al.*, 2003; Yologlu *et al.*, 2015). Além disso, os girinos são onívoros, filtradores macrófagos e ingerem qualquer material proveniente de sedimentos (Singh *et al.*, 2016). Essas características reforçam a necessidade de monitoramento para o controle das concentrações de metais, especialmente em ambientes aquáticos.

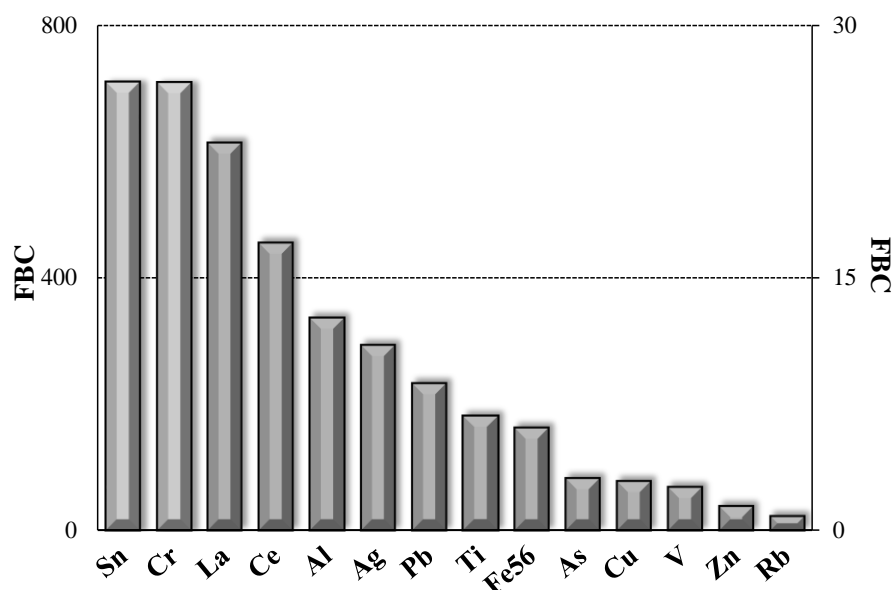
Estas múltiplas vias de exposição podem ter contribuído para a acumulação de metais essenciais (Cr, Fe, Cu, Zn) e não essenciais com toxicidade reconhecida (Al, As, Pb, Rb, Sn, Ti, V), juntamente com elementos de terras raras (La, Ce) e metal nobre (Ag) no sangue de girinos após exposição aguda ao MPASe. Vale ressaltar que os metais essenciais são cruciais para múltiplas reações bioquímicas, além de atuarem como cofatores para diversas enzimas, mas podem ser tóxicos se a dose for suficientemente alta (Wood, 2011). Além disso, os compostos metálicos emergentes bioacumularam-se após apenas 4 dias de exposição ao MPASe, indicando o seu elevado potencial de bioacumulação nos girinos. É, portanto, evidente que a bioacumulação se torna mais proeminente na presença contínua destes produtos na água.

Os anfíbios são comumente usados como espécies indicadoras da saúde do ecossistema e a bioconcentração de metais nos órgãos dos girinos, incluindo aqueles de preocupações emergentes, foram documentados em diversos estudos (Leduc *et al.*, 2016; Kelepertzis *et al.*, 2012; Peluso *et al.*, 2023; Urine *et al.*, 2007). Esses contaminantes foram identificados como um dos principais fatores relacionados à perda e ao declínio das populações de anfíbios nas últimas décadas (Ojha *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2016). Por outro lado, o Se foi o único elemento encontrado abaixo do LOD no sangue dos girinos expostos, mas detectado nos controles.

Esse micronutriente essencial é complexado com diversas enzimas e proteínas conhecidas como selenoproteínas que desempenham um papel fundamental na regulação redox celular, protegendo as células dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (EROs) e do dano oxidativo (Liao *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2023). O selênio atua como antagonista da toxicidade metálica, mitigando os efeitos do estresse oxidativo por meio da quelatação de metais por selenoproteínas (Schofield, 2017; Werder *et al.*, 2020), o que poderia explicar a depleção desse elemento em girinos expostos ao MPASe.

Os valores de FBC no sangue total de girinos expostos ao MPASe são mostrados na Figura 13. Os valores de FBC seguiram a ordem $\text{Sn} \approx \text{Cr} > \text{La} > \text{Ce} > \text{Al} > \text{Ag} > \text{Pb} > \text{Ti} > \text{Fe} > \text{As} \approx \text{Cu} > \text{V} > \text{Zn} > \text{Rb}$. O FBC fornece um índice da capacidade do girino de acumular metais e metaloides em relação à concentração de metais na coluna de água. Nnaji *et al.* (2023) descrevem que a bioconcentração de metais ocorre quando a quantidade de metais acumulada em um organismo excede as concentrações presentes a de seu ambiente. Esses valores variaram em ordens de grandeza e os maiores valores de FBC foram encontrados para metais não essenciais (Sn, Ag, Pb, Ti, Fe) e elementos de terras raras (Ce, La).

Figura 13- Fator de bioconcentração (FBC) de metais e metaloides no sangue total de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) expostos a 1 g.L-1 de MPASe por 96 h.



Para Sn, Ag, Zr e Nb, foram utilizados valores de LOD de amostras de água para estimar o FBC.

Fonte: a autora.

Este fenômeno indica a concentração das formas biodisponíveis de contaminantes metálicos emergentes do MPASe, que, por sua vez, não são regulamentados pela legislação ambiental vigente, especialmente em países em desenvolvimento. Além disso, a ausência de regulamentação adequada pode promover impactos ecológicos negativos, sendo necessário considerar a necessidade de atualizações nas políticas ambientais vigentes (Souza *et al.*, 2021b; Starling *et al.*, 2019). Adicionalmente, pouco se sabe sobre o destino ambiental e a toxicidade dos elementos emergentes, com a maioria das pesquisas toxicológicas focadas em faixas de concentração muito superiores aos níveis ambientais (Qvarforth *et al.*, 2022).

Em particular, os elementos terras raras são altamente reativos porque são facilmente oxidados (Klingelhöfer *et al.*, 2022). Estudos anteriores relataram que La, Ce e Nd entram nos hepatócitos e se acumulam principalmente nos núcleos e induzem danos oxidativos em mamíferos, o que pode afetar negativamente a função imunológica, uma vez que a exposição metálica promove o efeito imunomodulador. (Kawagoe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2011). Tendo em vista a sensibilidade e a importância dos anuros nos ecossistemas, nossas descobertas apontam a necessidade de monitoramento e controle dos impactos do MPASe nos ecossistemas aquáticos.

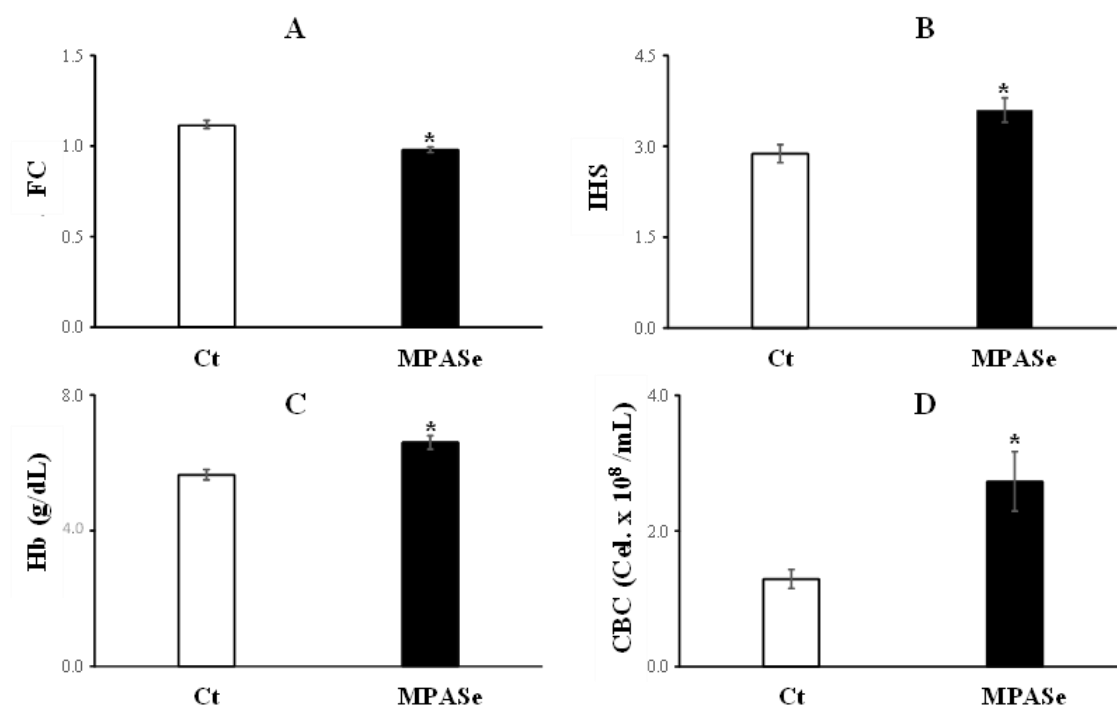
A exposição ao MPASe causou efeitos tóxicos, mutagênicos, genotóxicos e bioacumulativos nos girinos, mas não afetou a taxa de sobrevivência, pois não foi observada

mortalidade induzida por exposição ao MPASe. No entanto, foram observadas alterações comportamentais em girinos expostos ao MPASe, incluindo natação errática e letargia. A partir dos resultados observados, esses comportamentos anormais sugerem neurotoxicidade e podem impactar indiretamente na alimentação, além de aumentar a vulnerabilidade aos predadores (Silva *et al.*, 2021). Respostas típicas dos girinos à exposição subletal a metais incluem diminuição do desempenho locomotor, torção da cauda e redução de sua atividade (Sievers *et al.*, 2018). Cabe ressaltar que, girinos de rã-touro expostos por 96 horas durante 16 dias à solução de rejeitos de mineração contendo Al, Cd, Fe, Mn, Pb e Zn exibiram a diminuição da velocidade de natação e a redução da distância percorrida (Giroto *et al.*, 2020).

Além disso, níveis elevados de Al, Sn, Pb, Zn, Cr e Cu no sangue, assim como a presença de metais emergentes, como Ti, Rb, V, Ce e La encontrados em girinos expostos ao MPASe, podem induzir disfunção cerebral (Caito e Aschner, 2015; Park, *et al.*, 2016). Com base nas evidências apresentadas, a exposição ao MPASe pode impactar o desempenho natatório e a adaptabilidade dos girinos às mudanças ambientais. Embora não tenha afetado a sobrevivência, essas implicações, em conjunto, podem afetar o animal a longo prazo.

Os valores médios dos índices biométricos (FC e IHS) dos girinos de rã-touro dos grupos Ct e MPASe são mostrados nas Figuras 14A e 14B. Um aumento significativo (25%) no IHS foi encontrado em girinos expostos ao MPASe, enquanto a FC diminuiu significativamente (12%). O IHS é um importante indicador das reservas energéticas do fígado (Robinson *et al.*, 2021). O conteúdo de hemoglobina (Hb) e o hemograma completo (CBC) dos girinos expostos ao MPASe foram significativamente maiores (17% e 112%, respectivamente) quando comparados ao grupo Ct (Figura 14C e 14D). Essas mudanças sugerem uma resposta fisiológica típica de estresse.

Figura 14- (A) Fator de condição (FC), (B) Índice hepatossomático (IHS), (C) Conteúdo de hemoglobina (Hb) e (D) Contagem total de células do sangue (CBC) de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12).



Os valores são média ± E.P.M. Os grupos foram comparados usando o test-t de Student. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Estudos demonstram que, valores elevados de IHS na família Ranidae podem ser causados pela bioacumulação de metais pesados (Gürkan *et al.*, 2014; Loubordis e Vogiatzis, 2002; Karapetyan, *et al.*, 2011; Zaripova *et al.*, 2009). Esses valores também estão associados com respostas compensatórias, como hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos (Grigoryan e Karapetyan, 2006; Karapetyan *et al.*, 2011), uma vez que o fígado desempenha um papel crucial nos processos de desintoxicação. Os resultados desse estudo indicam que metais e metalóides constituintes do MPASe podem induzir alterações na microestrutura das células hepáticas, sugerindo hepatomegalia e alteração da função hepática. Por outro lado, os valores mais baixos de FC refletem a deterioração e comprometimento da condição física geral dos girinos expostos ao MPASe.

A FC é um bioindicador integrativo do estado de saúde e da condição fisiológica, refletindo o estado nutricional corporal (Sutton *et al.*, 2000; Barrilli *et al.*, 2015) e pode fornecer informações sobre potenciais impactos de poluição (Zhelev *et al.*, 2015). Pesquisas realizadas apontam que, os anfíbios de áreas contaminadas geralmente apresentam FC baixo

(Thammachoti *et al.*, 2012; Hegde e Krishnamurthy, 2014) e animais menores são mais propensos e vulneráveis à predação (Hayes *et al.*, 2006).

Como descrito por Morado *et al.* (2017) as alterações nas taxas de crescimento podem ser induzidas por contaminantes devido à realocação energética para mecanismos de desintoxicação, esgotando as reservas que foram inicialmente projetadas para o crescimento. Conseqüentemente, a tolerância à exposição ao MPASe pode estar associada a um aumento na demanda energética para manter a homeostase e garantir a sobrevivência do girino, diminuindo a energia disponível para crescimento e metamorfose.

Com base nas evidências apresentadas, nossos resultados confirmam que a exposição a metais e metalóides constituintes do MPASe são prejudiciais à saúde e à homeostase dos girinos, provocando, alterações significativas na massa corporal e no crescimento. O atraso no crescimento induzido pela exposição aos metais pode contribuir para o declínio dos anfíbios, uma vez que os girinos permanecem por mais tempo em fases vulneráveis, devido ao seu tamanho reduzido (Veronez *et al.*, 2016).

De acordo com Carvalho *et al.* (2017) a hemoglobina dos girinos pode aumentar após exposição a metais na tentativa de melhorar a capacidade de transporte de oxigênio para atender à maior demanda metabólica de energia necessária para tolerar condições adversas de estresse. Respostas semelhantes também foram observadas em girinos de rã-touro expostos a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd ou a uma mistura de Zn+Cd e Cu+Cd (Carvalho *et al.*, 2017) e em rã-do-pantanal *Pelophylax ridibundus*, habitando dois rios altamente poluídos conforme estudos de Zhelev *et al.* (2013).

As células sanguíneas são altamente sensíveis a alterações nos estados fisiológicos dos animais, e o hemograma completo constitui uma importante ferramenta utilizada para monitorar o estado de saúde em resposta a alterações relacionadas com a nutrição, qualidade da água e doenças (Fazio, 2019; Chen *et al.*, 2022). Estudos anteriormente relatam alterações no hemograma (contagem de eritrócitos, leucócitos e trombócitos) em resposta ao estresse e à poluição nos girinos de *Rana esculenta*, *Rana catesbeianus*, *Polypedates cruciger* e *Rana pipiens* (Barni *et al.*, 2007; Bennet e Alspaugh, 1964; Carvalho *et al.*, 2017; Manasee, Weerathunga e Rajapaksa, 2020) refletem as respostas adaptativas e compensatórias dos anfíbios em condições adversas.

As frequências de diferentes tipos de células sanguíneas, incluindo eritrócitos, linfócitos, basófilos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos de girinos do Ct e MPASe são mostradas na Tabela 4 e adicionalmente na Figura 15.

Tabela 4- Frequências de células sanguíneas diferenciais de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). Os valores são média \pm E.P.M .

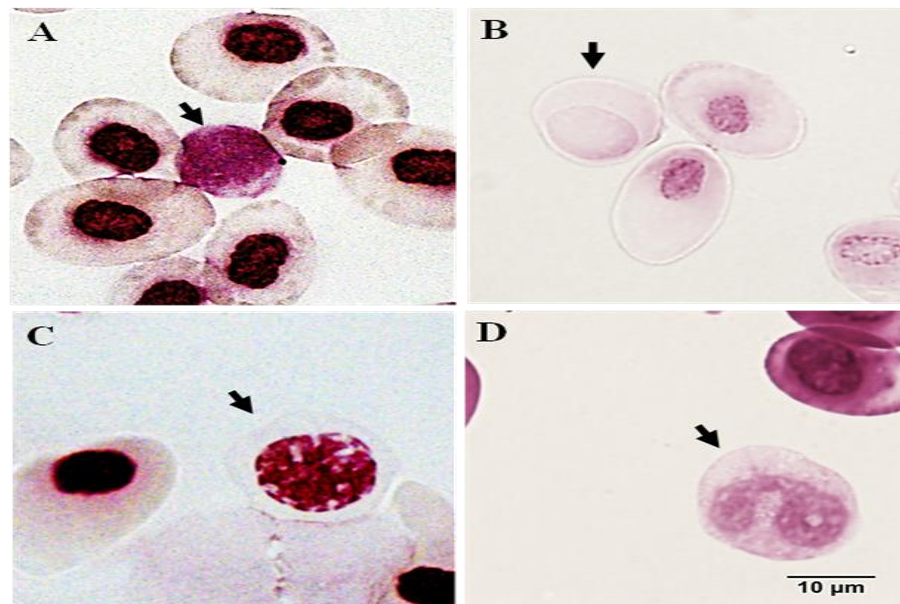
Tipos de Células	Número em 1000 células	
	Ct	MPASe (1.0 g.L ⁻¹)
Eritrócitos	948,8 \pm 6,9	916,1 \pm 7,1*
Trombócitos	7,7 \pm 1,7	14,7 \pm 2,7*
Leucócitos	26,4 \pm 3,2	48,0 \pm 6,3*
Linfócitos	2,2 \pm 0,6	3,9 \pm 1,3
Monócitos	18,8 \pm 2,4	33,5 \pm 3,4*
Neutrófilos	2,0 \pm 0,8	1,7 \pm 0,7
Basófilos	1,5 \pm 0,5	6,2 \pm 2,8
Eosinófilos	0,1 \pm 0,001	0,0 \pm 0,000

Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Os girinos expostos ao MPASe apresentaram valores significativamente mais elevados de leucócitos (82%), trombócitos (90%), monócitos (78%), enquanto a contagem de eritrócitos foi reduzida (3,4%). Em contraste, os valores médios de linfócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos não apresentaram diferenças entre os grupos. Variações anormais no número de diferentes tipos de células sanguíneas podem estar associadas a inflamação, distúrbios hematopoiéticos, doenças infecciosas, parasitemia e alterações homeostáticas (Peng *et al.*, 2018).

A contagem de leucócitos geralmente reflete a condição imunológica específica e inespecífica, enquanto os trombócitos desempenham um papel fundamental na coagulação e na hemostasia, obstruindo os vasos sanguíneos danificados (Chen *et al.*, 2022; Manasee, Weerathunga e Rajapaksa, 2020). Especialmente, o aumento no número de monócitos após a exposição ao MPASe indica uma mobilização celular para proteger o corpo contra infecções ou resposta inflamatória após dano tecidual. Como observado por Huang *et al.* (2022) metais como Pb, Mn, As, Cu e Cd podem provocar leucocitose e apresentar efeitos de imunomodulação sinérgica nas contagens de glóbulos brancos e eosinófilos.

Figura 15- Células sanguíneas de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*). Setas indicam (A) linfócito, (B) monócito, (C) basófilo, e (D) neutrófilo. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), ampliação de 100×, barra 10 µm.



Fonte: a autora.

Os monócitos são células essenciais dos sistemas imunológicos inato e adaptativo devido à sua capacidade de se diferenciar em macrófagos ou em células dendríticas (Domínguez e Ardavín, 2010). Portanto, o aumento do número de monócitos reflete a demanda por defesa tecidual do hospedeiro, início e resolução da inflamação e reparo tecidual (Wolf *et al.*, 2019).

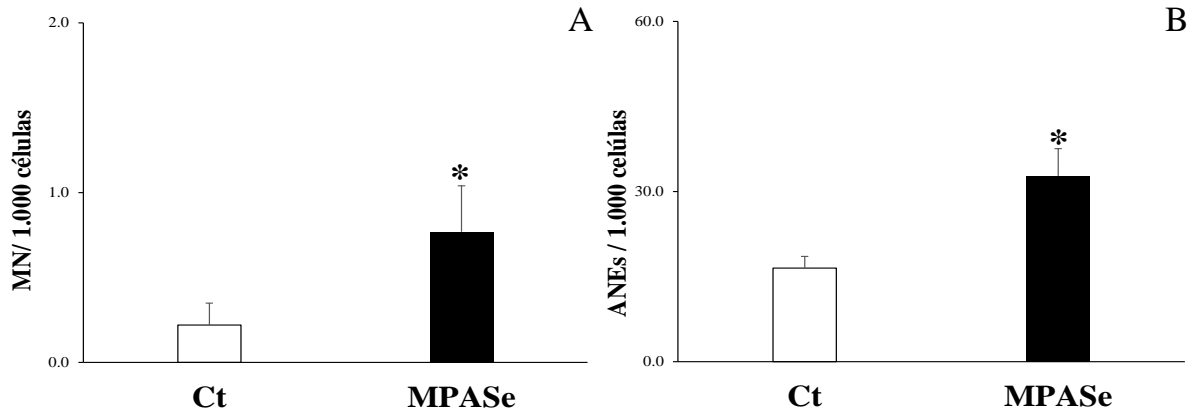
Além desta consideração, sob condições de estresse (por exemplo, exposição a metais pesados), o número de trombócitos pode aumentar (Casillas e Smith, 1977; Witeska, 2005), bem como a produção, ativação, migração e diferenciação de monócitos (Gogoi *et al.*, 2019; Ghosh *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2008). Por outro lado, os metais podem induzir a destruição dos eritrócitos, prejudicando a eficiência da capacidade de transporte de oxigênio (Medina *et al.*, 2016; Kotsanis *et al.*, 2000).

O declínio dos eritrócitos nos girinos expostos ao MPASe foi acompanhado por um aumento nos valores de Hb, provavelmente como um mecanismo para otimizar o transporte de oxigênio no sangue. Além disso, a quantidade de Fe (metal essencial) armazenado nos eritrócitos após a exposição ao MPASe também pode ter contribuído para a produção de hemoglobina, uma vez que a síntese do heme é regulada positivamente pela disponibilidade de ferro dentro de uma faixa de concentração fisiológica (Chiabrando *et al.*, 2014).

Além dos distúrbios tóxicos e hematológicos discutidos acima, efeitos mutagênicos também foram observados em girinos de *A. catesbeiana* após exposição ao MPASe. Os dados

obtidos sobre a frequência de MN e ENAs em eritrócitos de girinos de rã-touro dos grupos Ct e MPASe são mostrados na Figura 16A e 16B. A frequência de MN em eritrócitos do sangue periférico de girinos de rã-touro expostos a uma concentração subletal de MPASe foi significativamente maior (340 %) do que no grupo controle.

Figura 16- Frequência de (A) micronúcleo (MN) e (B) soma de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) no sangue periférico de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12).

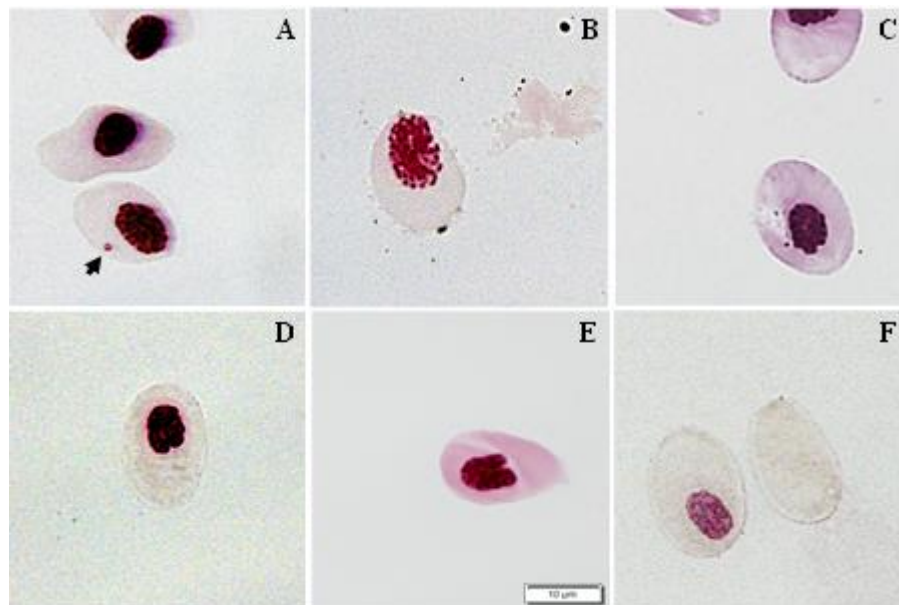


Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Os micronúcleos foram detectados como estruturas esféricas únicas e pequenas que se assemelham morfológicamente ao núcleo principal (Figura 17A). A formação de MN pode resultar da quebra de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não conseguem migrar para os pólos mitóticos durante o estágio de anáfase da divisão celular (Bhuyan *et al.*, 2020).

Os eritrócitos também apresentaram outras alterações morfológicas, como a célula apoptótica (Figura 17B), que apresentou desintegração nuclear com aparente fragmentação. O núcleo com bolha (Figura 17C), evidenciando morfologia semelhante ao MN, contudo, permanece conectado ao núcleo principal. O núcleo lobado (Figura 17D), que apresentou uma pequena incisão, resultando em uma separação parcial da porção nuclear. O núcleo entalhado (Figura 17E), que exibiu uma incisão mais pronunciada em comparação ao núcleo lobado. A célula anucleada (Figura 17F), que não apresentou um núcleo evidente.

Figura 17- Anormalidades nucleares eritrocitárias de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*). (A) Micronúcleo, (B) célula apoptótica, (C) núcleos com bolha, (D) núcleo lobado, (E) núcleo entalhado (F) célula anucleada. Ampliação 100×, barra 10 µm.



Fonte: a autora.

Estudos toxicológicos anteriores relataram que a exposição aos metais induz efeitos mutagênicos em anfíbios, levando a quebras no cromossomo e/ou desencadeando disfunção do aparelho do fuso mitótico durante a divisão celular, aumentando a frequência de MN (Islam *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2016; Patar *et al.*, 2016; Pollo *et al.*, 2015; Velma *et al.*, 2009).

Adicionalmente, os girinos expostos ao MPASe apresentaram aumentos significativos nas frequências de ENA total (140%) (Figura 15B), células AP (767%), núcleos BL (274%) e núcleos LB (223%) quando comparados aos controles (Tabela 5). Portanto, as frequências de alterações nucleares (lobadas e com bolhas) e a indução de apoptose mostraram-se associadas à exposição ao MPASe. Os núcleos LB são grandes dobras da membrana nuclear que não têm forma clara, enquanto os núcleos BL são pequenas estruturas semelhantes a MN, porém ligadas ao núcleo por um pedúnculo filiforme da cromatina (Bonomo *et al.*, 2021; Brahan *et al.*, 2017).

Tabela 5- Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). Os valores são média \pm E.P.M.

ANEs	Número em 1000 células	
	Ct	MPASe (1.0 g.L ⁻¹)
Célula anucleada (AN)	2,2 \pm 0,6	0,9 \pm 0,6
Célula apoptótica (AP)	0,6 \pm 0,2	5,2 \pm 1,6*
Célula binucleada (BN)	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
Núcleo com bolha (BL)	3,5 \pm 0,9	13,1 \pm 2,6*
Núcleo reniforme (RM)	4,1 \pm 0,8	4,6 \pm 2,1
Núcleo lobado (LB)	1,7 \pm 0,3	5,5 \pm 2,0*
Núcleo entalhado (NT)	1,6 \pm 0,5	2,8 \pm 0,7
Núcleo picnótico (PN)	2,2 \pm 0,6	2,8 \pm 1,1
Núcleo vacuolado (VA)	0,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,6

Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

O aumento de brotos nucleares tem sido associado à disfunção da tubulina e a eventos de instabilidade cromossômica através do ciclo de ruptura-fusão-ponte (Fenech *et al.*, 2011). Com relação às células apoptóticas, estas podem ocorrer a partir da fragmentação nuclear em corpos nucleares menores dentro de um citoplasma intacto, representando processos de morte celular (Benvindo-Souza *et al.*, 2020).

Estudos realizados por Patar *et al.* (2016) e Shaw *et al.* (2020) demonstraram que a apoptose intrínseca de eritrócitos maduros pode ser afetada por diversos estímulos, incluindo a exposição aos metais. Os íons metálicos em corpos d'água tem sido associados a alterações morfofuncionais nos eritrócitos, que podem resultar em diversos efeitos deletérios, como danos diretos às células eritrocitárias, redução do seu tempo de vida, aceleração da hemólise ou inibição da eritropoiese (Arnaudov e Arnaudova, 2023).

As anormalidades nos eritrócitos apresentam alta especificidade para poluentes como metais tóxicos, representando efeitos mutagênicos altamente significativos (Azevedo *et al.*, 2012; Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2021; Vijitkul *et al.*, 2022). Aumentos significativos nas frequências de ENAs sugerem que a mistura metálica do MPASe, mesmo em concentrações subletais, induz efeitos clastogênicos (quebras de cromossomo, mudanças estruturais, entre outros) e aneugênicos (formação de células com número anormal de

cromossomo, perda de cromossomos entre outros) em eritrócitos periféricos de girinos de rã-touro, prejudicando os sistemas de reparo de DNA.

O aumento da instabilidade genética induzida pela exposição a metais pode estar associado a síndromes genéticas, neoplasias, disfunções reprodutivas, atraso no crescimento e mortalidade (Alimba *et al.*, 2018; Bonomo *et al.*, 2021; Bhuyan *et al.*, 2020). Os resultados dos experimentos do teste cometa, que avaliaram os efeitos genotóxicos do MPASe em eritrócitos de girinos de rã-touro estão apresentados Tabela 6.

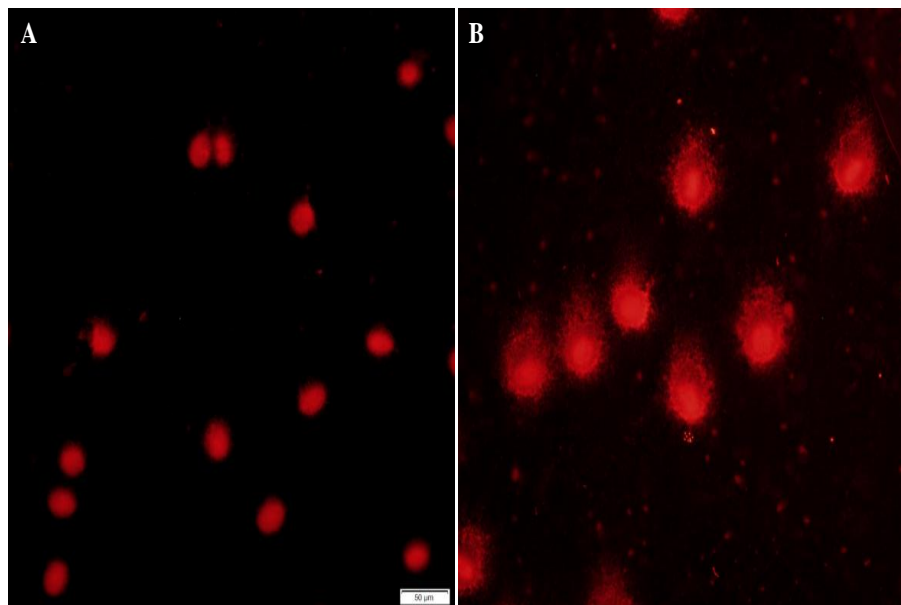
Tabela 6- Danos no DNA de eritrócitos de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12). Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados usando o teste t não pareado.

Parâmetros Teste Cometa	Ct	MPASe (1.0 g. L ⁻¹)
CA (pixels)	3330,0 \pm 302,9	4825,5 \pm 549,8*
TC (pixels)	63305,6 \pm 8383,9	117422,5 \pm 1296,2*
T (%)	25,7 \pm 2,5	33,0 \pm 2,6*
TL (μ m)	15,2 \pm 0,9	18,8 \pm 0,7*
TM (unidades arbitrárias)	10,9 \pm 0,9	13,8 \pm 0,7*
OM (unidades arbitrárias)	7,2 \pm 0,5	8,6 \pm 0,2*

CA = área do cometa; TC = conteúdo de DNA da cauda; T = conteúdo de DNA da cauda como porcentagem do conteúdo de DNA do cometa; TL = comprimento da cauda em pixels; TM = comprimento da cauda vezes % de DNA da cauda; OM = momento olive da cauda, produto do DNA da cauda% e a distância entre os centroides ponderados pela intensidade da cabeça e da cauda. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Estimativas quantitativas revelaram que parâmetros considerados relevantes, como área do cometa, conteúdo de DNA da cauda, % de DNA da cauda, o comprimento da cauda, o momento da cauda e o momento olive da cauda, apresentaram aumentos significativos de cerca de 1,2 a 1,8 vezes nos indivíduos expostos em comparação com o grupo controle. A exposição ao MPASe aumentou a quebra da cadeia de DNA, resultando na migração de fragmentos de DNA formando estruturas semelhantes a cometas (Figura 18).

Figura 18- Teste cometa em girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe. (A) Controle, sem danos no DNA. (B) MPASe, com danos ao DNA. Barra = 50 μ m.



Fonte: a autora.

Esses achados sugerem que a exposição à mistura metálica provoca danos induzido pelo MPASe no DNA nos eritrócitos e pode afetar a saúde dos girinos de *A. catesbeiana*. Metais e metaloides podem causar efeitos nocivos em células somáticas ou germinativas (Dhawan, Bajpayee, e Parmar, 2009) e parecem ser a principal classe de contaminantes associados à genotoxicidade (Gusso-Choueri *et al.*, 2016).

O teste cometa é um método simples, sensível e rápido capaz de detectar quebras na fita de DNA no núcleo interfásico em células eucarióticas e é indicado para detectar genotoxicidade em girinos anuros, o que pode permitir estratégias de intervenção para prevenção ou redução de efeitos deletérios à saúde nas espécies sentinelas (Bhuyan *et al.*, 2020; Dhawan, Bajpayee, e Parmar, 2009).

A bioacumulação de Sr, Cr, La, Ce, Al, Ag, Pb, Y, Ti, Fe, As, Cu, V, Zn e Rb no sangue de girinos expostos ao MPASe pode estar diretamente relacionada à presença de agentes genotóxicos. Como observado por Jayawardena *et al.* (2021) uma mistura de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) induziu efeitos genotóxicos nas células sanguíneas da rã-verde indiana (*Euphlyctis hexadactylus*), com comprimento significativamente aumentado das caudas do cometa juntamente com a concentração de metais pesados.

Efeitos genotóxicos medidos pelo teste cometa também foram observados em eritrócitos de girinos de rã-touro após exposição de curto prazo ao Fe ou Zn. (Motta *et al.*, 2020;

Veronez *et al.*, 2016). Além disso, as nanopartículas metálicas podem causar respostas genotóxicas na forma de fragmentação cromossômica, quebras na cadeia de DNA e alterações nos perfis de expressão gênica em organismos aquáticos (Mahaye *et al.*, 2017). Uma indução semelhante de danos ao DNA, com base no aumento da % de DNA da cauda, comprimento da cauda e momento olive da cauda, foi observada nos girinos de *Dendropsophus minutus* expostos a nanopartículas de TiO₂ (do Amaral *et al.*, 2022).

3.4 Conclusão

A avaliação dos efeitos da exposição ao MPASe (1,0 g.L⁻¹/96h) no sangue dos girinos de rã-touro, *A. catesbeiana*, nos grupos controle e expostos por meio das análises de determinação de metais e metaloides, parâmetros hematológicos, mutagenicidade e contagem diferencial, e genotoxicidade, possibilitou a obtenção das seguintes conclusões:

Os resultados indicaram que metais e metaloides, incluindo os emergentes, encontrados no MPASe, têm a capacidade de se dissolver em água e se acumular no sangue de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) do grupo exposto, pois elevadas concentrações de Sn, Cr, La, Ce, Al, Ag, Pb, Ti, Fe, As, Cu, V, Zn e Rb, foram observadas nesse tecido.

Essa mistura multimetálica, mesmo em concentração subletal e ambientalmente relevante, mostrou-se potencialmente genotóxica e mutagênica para os girinos, causando alterações hematológicas quantitativas e morfológicas, associadas a uma condição de estresse induzido por metais. Além disso, afetou negativamente o comportamento e o crescimento, além de desencadear danos ao fígado após exposição de curto prazo. Com base nas evidências apresentadas, a exposição ao MPASe levaria a um *trade-off* entre crescimento e alocação de energia para tarefas fisiológicas (função imune, transporte de gases respiratórios, mecanismos de reparo de DNA, desintoxicação do animal), resultando em redução do forrageamento, redução do tamanho corporal e maior suscetibilidade à predação durante a fase larval.

Cabe ressaltar que, o presente estudo fornece a primeira evidência de que partículas metálicas sedimentáveis atmosféricas liberadas pelas indústrias siderúrgicas perturbam as características da história de vida e desencadeiam danos ao DNA em anfíbios, contribuindo para o declínio populacional de espécies sensíveis. Consequentemente, os dados aqui apresentados reforçam a necessidade de uma legislação mais adequada para controlar a emissão do MPASe, o que é imprescindível para garantir a integridade dos ecossistemas aquáticos naturais e a proteção da biodiversidade, particularmente dos anfíbios.

3 CAPÍTULO III

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MATERIAL
PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL EMITIDO POR
INDÚSTRIAS METALÚRGICAS SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE
GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Aquarana catesbeiana*)**

3.1 Apresentação

O Capítulo III, apresenta os resultados das análises de bioconcentração de metais e metaloides no tecido cardíaco, frequência cardíaca, massa ventricular relativa, contratilidade cardíaca, e indicadores de estresse oxidativo do tecido cardíaco de girinos de rã-touro expostos ao MPASe (1g/L^{-1}) por 96 horas. Os resultados indicaram que respostas inotrópicas e lusitrópicas positivas no grup exposto representam uma resposta compensatória ao estresse de exposição. O bloqueio do trocador NCX pela adição de lítio resultou em redução da força de contração, indicando que o trocador tem um papel significativo na ciclagem de cálcio. No tecido cardíaco ocorreu estresse oxidativo evidenciado por aumentos nos níveis de proteína carbonilada. Este estudo fornece evidências de que a exposição ao MPASe causou alterações metabólicas além de ser indutora de estresse oxidativo.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Área de coleta

O Complexo do Tubarão é reconhecido mundialmente como o maior terminal de exportação de minério de ferro do mundo (Galvão *et al.*, 2018, 2022; Robles *et al.*, 2016). Nesse local de grande relevância econômica, encontram-se diversas operações relacionadas à siderurgia, incluindo a presença de oito usinas de pelletização de minério de ferro (Santos *et al.*, 2017). A Ilha do Boi, localizada na cidade de Vitória, Espírito Santo (Brasil) é diretamente impactada pela atividade siderúrgica realizada no Complexo do Tubarão, principalmente a emissão e dispersão de MPASe (Adorno *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2023 a,b).

As amostras de MPASe utilizadas nesse estudo foram caracterizadas por Costa *et al.*, (2024). O MPASe é composto por metais, metaloides e metais emergentes em concentrações médias de : Fe⁵⁶ ($1277,95 \pm 29,33 \mu\text{g.g}^{-1}$), Ti ($882,17 \pm 33,48 \mu\text{g.g}^{-1}$), Ba ($165,55 \pm 0,21 \mu\text{g.g}^{-1}$), Al ($80,08 \pm 2,32 \mu\text{g.g}^{-1}$), Pb ($72,00 \pm 0,25 \mu\text{g.g}^{-1}$), Sr ($70,17 \pm 0,66 \mu\text{g.g}^{-1}$), Ce ($43,95 \pm 0,16 \mu\text{g.g}^{-1}$), Zr ($32,60 \pm 0,52 \mu\text{g.g}^{-1}$), La ($20,45 \pm 0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$), Mn ($12,90 \pm 0,25 \mu\text{g.g}^{-1}$), Y ($11,05 \pm 0,11 \mu\text{g.g}^{-1}$), Rb ($5,55 \pm 0,11 \mu\text{g.g}^{-1}$), Zn ($4,99 \pm 0,08 \mu\text{g.g}^{-1}$), As ($3,04 \pm 0,07 \mu\text{g.g}^{-1}$), Sn ($2,19 \pm 0,10 \mu\text{g.g}^{-1}$), Mo ($2,04 \pm 0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$), Nb ($2,02 \pm 0,06 \mu\text{g.g}^{-1}$), Se ($1,32 \pm 0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$), W ($0,92 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$), Cu ($0,81 \pm 0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$), Cd ($0,74 \pm 0,04 \mu\text{g.g}^{-1}$), Cr ($0,61 \pm 0,02 \mu\text{g.g}^{-1}$), Ni ($0,50 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$), V ($0,39 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$) e Ag ($0,23 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$).

3.2.2 Cuidados com animais e exposição ao MPASe

A obtenção dos girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner (Gosner, 1960), ocorreu em um ranário comercial localizado no município de Matão-SP (21°65'S e 48°38'W). Os animais foram transportados para o Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em São Carlos (SP). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar (CEUA-UFSCar), conforme o protocolo nº 4046210222.

Ao longo de 10 dias, os girinos foram aclimatados em tanque de 500 litros com recirculação de água bem aerada e sem cloro, mantida em temperatura constante ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), sob fotoperíodo natural. Durante esse período foram alimentados *ad libitum* com ração comercial em flocos (32% de proteína), retida 24 horas antes da exposição para preservar a qualidade da água. Os girinos foram transferidos aleatoriamente para aquários de 180 L e permaneceram por 2 dias antes do experimento para recuperação do estresse.

Os animais (48 animais por grupo) foram divididos em dois grupos (grupo Controle e MPASe) que foram separados em quatro aquários de vidro (180 L cada). O grupo controle (Ct) foi mantido em água limpa em dois aquários (24 animais por aquário), o grupo MPASe foi exposto à concentração ambientalmente relevante de $1,0 \text{ g/L}^{-1}$ por 96 h em dois aquários (24 animais por aquário). Parâmetros da qualidade da água foram mantidos estáveis: temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ que foi medida usando um termômetro, pH 6,7 - 7,5, oxigênio dissolvido 6,5 - 7,8 mg/L, dureza 50 - 65 mg/L (como CaCO_3), condutividade 68 - 104 $\mu\text{S/cm}$ e concentrações de amônia permaneceram em abaixo de 1 mg/L^{-1} .

Durante a exposição, o comportamento dos animais foi observado e registrado, pontuando alterações quanto ao desempenho natatório, letargia, sinais de estresse, ao longo de quatro intervalos diários distintos. Ao final do período experimental, os girinos foram eutanasiados com overdose de benzocaína 0,5%, para coleta do tecido cardíaco para análise bioquímica, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C . Com o objetivo de evitar qualquer interferência decorrente da utilização de anestésicos (AVMA, 2001), a concussão cranial seguida de secção da medula espinhal, foi realizada para coleta do tecido cardíaco para a análise da contratilidade miocárdica.

3.2.3 Análises no ICP-MS

O procedimento descrito por (Monferrán *et al.*, 2016), foi seguido com algumas modificações de Souza *et al.*, (2021a), para análise química. Para determinar a concentração de

metais e metaloides, amostras de coração foram liofilizadas, maceradas e trituradas. A amostra pesando 0,1 g (peso seco) foi submetida a digestão ácida utilizando 3 mL de ácido nítrico, 750 µl de ácido nítrico e 250 µl de peróxido de hidrogênio por 24 horas a 100°C, conforme descrito por (Costa *et al.*, 2024). As amostras foram filtradas em um filtro de nitrocelulose de 0,45 µm (Milipore -São Paulo, Brasil).

Medições de 27 elementos químicos (Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe⁵⁶, Hg²⁰², La, Mn, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Se, Sn, Sr, Ti, V, W, Y, Zn e Zr), foram realizadas em triplicata no coração de girinos de rã-touro usando ICP-MS de acordo com o método 200.8 (USEPA, 1996), no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Córdoba (ICYTAC), na Argentina. A solução padrão multielementar Merck VI CertiPUR® foi utilizada para as curvas de calibração para o ICP-MS, permitindo a quantificação de metais nas amostras.

O fator de bioconcentração (FBC) foi determinado para avaliar a acumulação de metais no tecido cardíaco, foi utilizada a seguinte equação: $FBC = \text{mg.kg} / \text{mg.L}$ (Adorno *et al.*, 2023). Os metais na água que estavam com as concentrações abaixo do limite de detecção (LOD) não foram calculados.

3.2.4 Parâmetros fisiológicos

Após a concussão craniana os girinos de rã-touro foram submetidos a uma abertura cirúrgica em direção caudal-cranial para observação do coração por meio da remoção da camada pericárdica e determinação da frequência cardíaca de ambos os grupos experimentais (Ct e MPASe) a qual foi expressa em batimentos por minuto (bpm). Posteriormente, os corações foram pesados para obtenção da massa ventricular relativa (MVR) determinada pela fórmula ($Mvr\text{-}\%Mc$), ambos procedimentos de acordo com Costa *et al.* (2015, 2018) e realizados por Dall-Medico *et al.* (2014) e Adorno (2021).

Para a análise de Contratilidade cardíaca *ex vivo*, as etapas experimentais seguiram o descrito por (Costa *et al.*, 2008) com adaptações (Adorno *et al.*, 2023; Gonçalves *et al.*, 2024). Após medir a frequência cardíaca, os corações foram dissecados (remoção do átrio), e transferidos para uma solução de ringer com a seguinte composição: 115,0 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 30 mM de NaHCO₃, 0,94 mM de MgSO₄, 2,5 mM de CaCl₂, pH 7,5. Em seguida foram fixados pelas extremidades em anéis metálicos.

A preparação foi transferida para uma cubeta contendo solução Ringer mantida a 25°C, borbulhada com mistura carbogênica (2% CO₂ e 98% O₂). Um dos anéis metálicos foi preso a

um gancho localizado próximo a um eletrodo conectado ao estimulador elétrico (Grass S88) que gera pulsos elétricos com 8 ms de duração permitindo assim a estimulação elétrica necessária para alcançar o limiar da resposta mecânica (80 V, ~150 mA).

Posteriormente, a preparação foi suspensa verticalmente para que o outro anel metálico fosse conectado através de um fio de aço a um transdutor de força isométrica (Grass FT 03 Transducer, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) para permitir o registro da força de contração do miocárdio ventricular, através de um sistema de aquisição de dados AcqKnowledge MP150 (Biopac Systems Inc.).

Dessa forma, as tiras foram estimuladas e estabilizadas a uma frequência constante de 0,2 Hz (12 bpm), para a realização do protocolo de força-frequência.

a. Relação força-frequência: avaliação do acoplamento E-C em diferentes frequências de estimulação, por meio de incrementos graduais de 0,2 Hz até que 80% dos registros se tornassem irregulares.

b. Efeitos da inibição do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) na contratilidade cardíaca: repetição do protocolo experimental de força-frequência com a substituição do NaCl por 125 mM LiCl na solução de Ringer para inibir a função do trocador NCX (Smith e Allen, 1988).

Os protocolos para avaliar a contratilidade cardíaca foram aplicados para os girinos dos grupos Ct e MPASe (n mínimo de 12). Após cada protocolo as tiras ventriculares foram secas em papel filtro para determinar o peso úmido da porção da tira responsável pelas contrações isométricas. A massa e o comprimento foram usados para o cálculo da área de seção transversa (CSA – *cross-sectional area* – mm^2) assumindo a densidade muscular de $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$ (Layland *et al.*, 1995).

A força de contração (F_c – mN.mm^{-2}) de cada tira ventricular foi calculada pela diferença entre os valores do pico da tensão isométrica e de repouso dividida pelo valor CSA de sua respectiva tira ventricular. A taxa de contração ($+dF_c/dT$ – $\text{mN.mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), a taxa de relaxamento ($-dF_c/dT$ – $\text{mN.mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), e o índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC – $\text{mN.mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), calculado como o produto da F_c pela frequência de estimulação.

3.2.5 Preparo dos tecidos

As amostras do tecido cardíaco (*pool* de 3-4) foram homogeneizadas em sonicador ultrassônico de ponteira (ECO-Sonics, QR 500, Brasil), em seguida foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4°C. Para a análise de Capacidade Antioxidante Total (ACAP), as

amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCL 100 mM (pH 7,5), 2mM EDTA e 5 mM de Mg^{2+} . Para as análises de proteína carbonilada, DNA-SB, LPO, GSH as amostras foram homogeneizadas usando tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,6). A quantificação da concentração de proteína em cada amostra seguiu o protocolo descrito por Bradford (1976), empregando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão de referência. A leitura de absorvância a 595 nm, utilizando um leitor de microplacas.

3.2.6 Níveis de lipoperoxidação (LPO)

A quantificação de lipídios que sofreram oxidação (LPO), foi realizada pelo método FOX (Ferrous oxidation-xylenol orange), conforme o procedimento descrito em Jiang *et al.* (1991, 1992), realizado por Monteiro *et al.* (2006) e Adorno (2021). Esse método consiste na capacidade dos hidroperóxidos lipídicos de oxidar íons ferrosos (Fe^{2+}), a íons férricos (Fe^{3+}), em meio ácido, na presença de um pigmento de Fe (III), o alaranjado de xilenol que tem pico de absorção a 560 nm, permitindo a detecção por espectrofotometria.

As amostras homogeneizadas foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA 10%), e incubadas a 25°C (40 min), com mistura reativa contendo 100 mM de alaranjado de xilenol, 4 mM do antioxidante butilato hidroxitolueno (BHT), 25 mM de H_2SO_4 (ácido sulfúrico), e 250 mM de $FeSO_4$ (sulfato ferroso amoniacal), em metanol a 90%. No escuro as amostras foram incubadas (40 min), a leitura foi realizada em espectrofotômetro, Bel (UV-VIS, BEL Engineering, Italy). Os resultados foram expressos em equivalentes de cumeno hidroperóxido ($nmol.mg$ de proteína⁻¹).

3.2.7 DNA Strand-break

A avaliação do dano ao DNA das células cardíacas foi realizada através do procedimento simplificado e de curta duração para detectar quebras de fitas de DNA, conforme descrito por Olive (1988), com modificações. Para a realização do teste, 200 μ l de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 2%), foram adicionados a 25 μ l de amostras previamente homogeneizadas. Posteriormente, foram adicionados 200 μ l de KCl 0,12 M, o precipitado foi submetido a banho térmico de 60°C (10 min). Em seguida, a mistura foi incubada (4°C), por 30 minutos e centrifugado a 8.000 g (4°C), por 5 min.

A análise foi realizada em microplacas adicionando-se 150 μ l de solução Hoechst (1 μ l/mL) a 50 μ l do sobrenadante. A microplaca foi então agitada a 200 rpm por 5 min. A leitura foi realizada medindo a fluorescência (excitação 360nm; emissão 460nm). Na ausência de

danos o DNA precipita com as proteínas, o DNA danificado não precipita e permanece no sobrenadante. A determinação das quebras de fitas de DNA nas amostras usou uma curva padrão de ácido desoxirribonucleico de baixo peso molecular de esperma de salmão. Os resultados foram expressos em quantidade de DNA por grama de tecido.

3.2.8 Níveis de proteína carbonilada (PC)

A quantificação de carbonilas em proteínas (PC), foi realizada conforme o procedimento descrito em Reznick e Packer (1994). As carbonilas presentes nas proteínas reagem ao 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DPNH) formando um composto conjugado de proteína e dinitrofenil-hidrazona de cor amarela/laranja detectável entre a faixa de 355 a 390 nm. Essa absorvância é diretamente proporcional a quantidade de carbonilas presentes, permitindo a quantificação do dano oxidativo (Lushchak, 2011).

Para a análise 200 µl de sobrenadante foram divididos em dois tubos sendo 100 µl para o teste e 100 µl para o controle. Foram adicionados 250 µl de HCl 2M aos tubos controle, e 250 µl do meio de reação foram adicionados aos tubos de teste. As amostras foram incubadas a 37°C (90° min), ao final do período as amostras foram transferidas para um banho de gelo para interrupção da reação. Para formação de precipitado foram adicionados 350 µl de solução de ácido tricloroacético (28%) seguida da mistura em vortex. A preparação foi centrifugada 9.000 g (4°C), por 10 min o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O precipitado foi ressuspenso em 500 µl de uma solução gelada de etanol-acetato de etila, agitado e centrifugado a 9.000 g (4°C), por 10 min, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Este procedimento foi repetido três vezes até que a solução etanol-acetato de etila se tornasse transparente. Foram utilizados 420 µl de solução de hidrocloreto de guanidina para ressuspenção, seguidos de agitação a 37°C por 10 min. A amostra foi centrifugada 9.000 g por 3 min para eliminar material insolúvel. A análise foi realizada em microplacas adicionando-se nos poços 200 µl das amostras em duplicata. A absorvância das amostras foi realizada utilizando o comprimento de onda de 355 nm. O conteúdo de grupamentos carbonil foi calculado utilizando o coeficiente de extinção hidrazona = 0.022 Enmol ml^{-1} , os resultados são expressos como nmol prot.⁻¹.

3.2.9 Níveis de glutathiona na forma reduzida (GSH) oxidada (GSSG)

A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foram determinadas usando o ensaio descrito por Anderson (1985). Os sobrenadantes das amostras foram extraídos após a centrifugação e tratados com ácido sulfossalicílico 5%, posteriormente

centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 4°C. A taxa de formação de ácido tió-nitrobenzóico (TNB) foi monitorada em 412 nm indicando quantidades de glutathiona total (GSH mais GSSG) ou GSSG. Os níveis de GSSG foram medidos após o tratamento dos sobrenadantes com vinilpiridrina para sequestrar o GSH (Cunha Bastos *et al.*, 2007). Os conteúdos totais de GSH foram apresentados em nmol GSH/ mg prot e GSSG apresentados como nmol GSSG/ mg prot utilizando curvas padrão. A proporção GSH/GSSG foi definida pela fórmula: $GSH/GSSG: [(GSH-2 \cdot GSSG)] / GSSG$, os valores foram expressos como equivalentes de GSH ($GSH = GSH + 2 \cdot GSSG$).

3.2.10 Capacidade antioxidante total (ACAP)

Foi utilizado o método de curta duração para estimar a capacidade antioxidante total contra radicais peroxila – ACAP (Amado *et al.*, 2009). A concentração de proteínas (Bradford, 1976) no sobrenadante foi previamente testada em três diferentes concentrações (0,5, 1, 2 mg/ml⁻¹), para obtenção do melhor ajuste de curva dos dados de fluorescência ao longo de 30 minutos. Com base nos resultados a concentração de 2mg/ml⁻¹, foi selecionada para análise.

O sobrenadante do homogeneizado da amostra e o tampão de reação 30mM HEPES, 200mM KCl, 1mM MgCl₂, pH 7,2, e 40µM 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H2-DA), foram pipetados em uma microplaca de 96 poços, para cada amostra foram utilizados seis poços. Três dos seis poços receberam a adição de 4Mm de 2',2'-azobis-2-metilpropinamidina di-hidrocloreto (com ABAP) os três poços restantes receberam água ultrapura (sem ABAP). Para decomposição térmica de ABAP e subsequente formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as amostras foram monitoradas por 30 min a 35°C com leituras a cada 5 min. A intensidade da fluorescência foi realizada utilizando comprimentos de ondas de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão (Spectra Max, M3). A diferença na área de EROs entre amostras com e sem ABAP sugere a medida de ACAP da amostra. Os resultados foram expressos como 1/área relativa de acordo com Klein *et al.* (2017), pois fornece uma interpretação direta, onde valores mais altos indicam maior ACAP.

3.2.11 Análise estatística

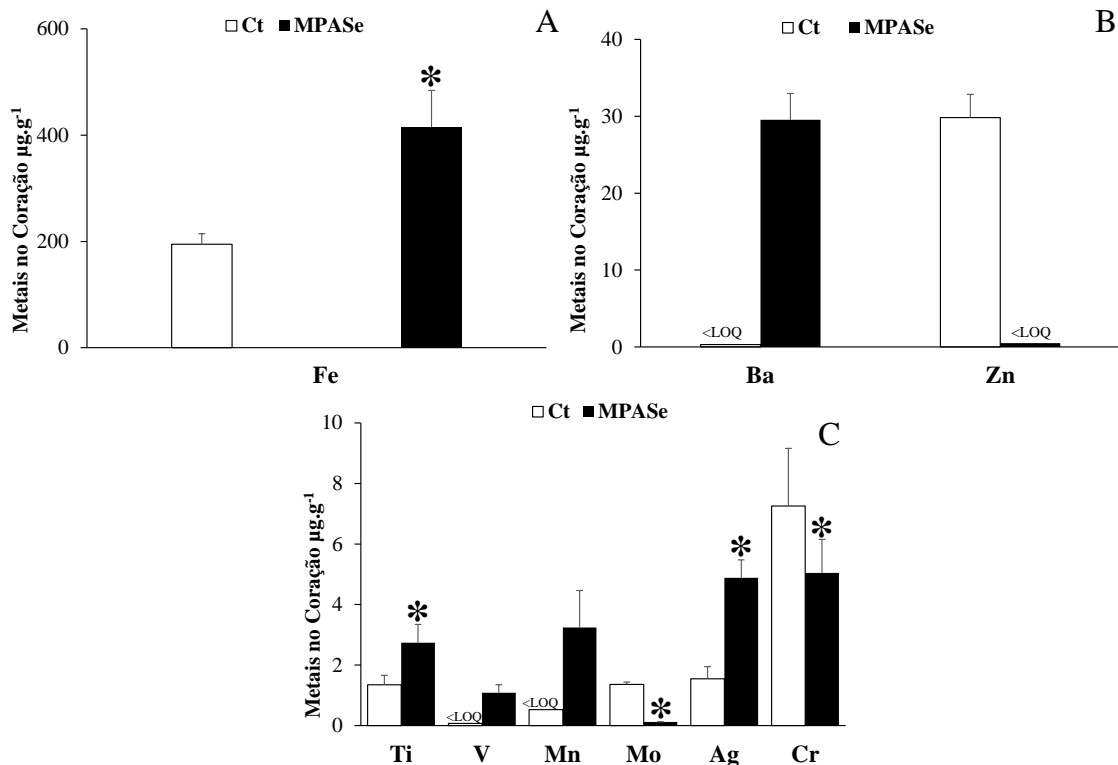
Foram utilizadas as seguintes análises estatísticas: test-t de *Student* ou seu correspondente não paramétrico Mann-Whitney para verificar possíveis diferenças significativas entre os grupos (Ct e MPASe). Para comparações dos parâmetros de contratilidade ao longo de incrementos da frequência de estimulação, foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas complementada pelo teste de Dunnet de comparações múltiplas. Os

valores foram expressos em média \pm E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% ($P < 0,05$) de significância foram consideradas.

3.3 Resultados e Discussão

Dos 28 metais analisados no tecido cardíaco exposto ao MPASe, os resultados mostraram que o Fe^{56} (Figura 19 A) apresentou concentração superior ao encontrado no grupo Ct (cerca de 2 vezes). O Ba apresentou aumento de cerca de 95 vezes, enquanto o Zn redução de aproximadamente 62 vezes em relação aos valores de LOQ (Figura 19 B). Além disso, os metais Ti, V, Mn e Ag tiveram elevações expressivas cerca de 39, 15, 6, e 3 vezes respectivamente (Figura 19 C). Enquanto os metais Mo e Cr mostraram redução de aproximadamente 11e 1,4 vezes, respectivamente em comparação ao grupo Ct após 96 horas de exposição (Figura 19 C).

Figura 19- (A) Concentração de ferro; (B) Concentração de bário e zinco; (C) Concentração de titânio, vanádio, manganês, molibdênio, prata e cromo, no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n:3).

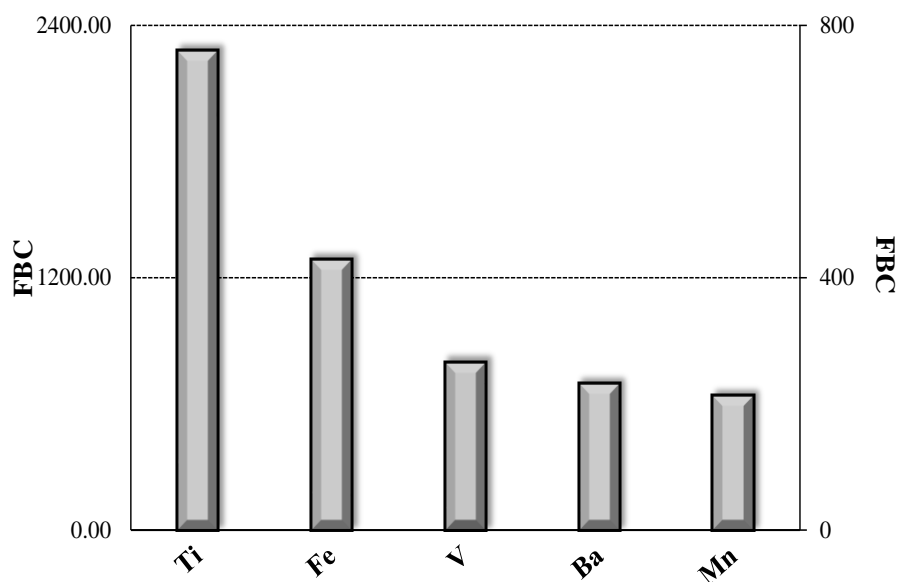


Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados pelo teste T ou Mann-Whitney. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Os valores do FBC no tecido cardíaco dos animais expostos ao MPASe são mostrados na Figura 20 e apresentaram a seguinte ordem decrescente: $\text{Ti} \approx \text{Fe}^{56} > \text{V} > \text{Ba} > \text{Mn}$. O FBC é

um índice utilizado para avaliar a capacidade de acumulação de metais e metaloides em relação à concentração de metais encontrada na água.

Figura 20- Fator de bioconcentração (FBC) de metais e metaloides no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) expostos a 1 g.L⁻¹ de MPASe durante 96 h (n:3).



Fonte: a autora.

A mistura metálica do MPASe é formada por partículas que podem sofrer dissociação, tornando-as disponíveis na água, ou depositadas no sedimento (Souza *et al.*, 2021a). Essa biodisponibilidade favorece a entrada de metais no corpo dos anfíbios e pode acontecer por três vias: epitelial, branquial e por ingestão de partículas sedimentadas no ambiente (Burger e Snodgrass, 1998; Lanctôt *et al.*, 2017).

No presente estudo, observou-se que o tecido cardíaco de girinos de rã-touro acumulou metais como Ti, Fe⁵⁶, V, Ba e Mn. A capacidade de acumulação pode estar relacionada com as vias de entrada de metais no organismo, bem como os processos biológicos como a absorção, o armazenamento e eliminação (Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2024; Dal-Medico *et al.*, 2014). A bioconcentração de metais ocorre devido à baixa eficiência dos mecanismos de desintoxicação dos mecanismos como a ativação das enzimas (Fortes *et al.*, 2023).

Estudos anteriores investigaram os efeitos dos constituintes do MPASe em girinos de rã-touro expostos por 96 horas a 1 g.L⁻¹ do pó e detectaram elevadas concentrações dos seguintes metais: Fe⁵⁶, Al, Sn, Cr, Mn no sangue, fígado, músculo branco e cérebro desses animais (Costa *et al.*, 2024; Fernandes *et al.*, 2024). Os autores descreveram que os efeitos tóxicos da exposição incluem: estresse oxidativo, evidenciado por níveis elevados de

lipoperoxidação, o que indica danos nas membranas celulares, além do aumento da atividade de colinesterase no músculo branco (Fernandes *et al.*, 2024). Costa *et al.*, (2024) observaram o aumento da concentração de hemoglobina, além de alterações nos eritrócitos como danos genotóxicos, mutagênicos e alterações morfológicas indicadoras de efeitos adversos no crescimento e na saúde desses animais.

Estudos sobre anfíbios destacam que a exposição a diferentes metais pode provocar alterações no crescimento, na taxa de reprodução, e na sobrevivência dos animais, além de exigir um aumento do gasto energético para realização de atividades essenciais como natação, alimentação e fuga de predadores (Carvalho *et al.*, 2017, 2020; Fernandes *et al.*, 2021, 2024; Motta *et al.*, 2020; Veronez *et al.*, 2016).

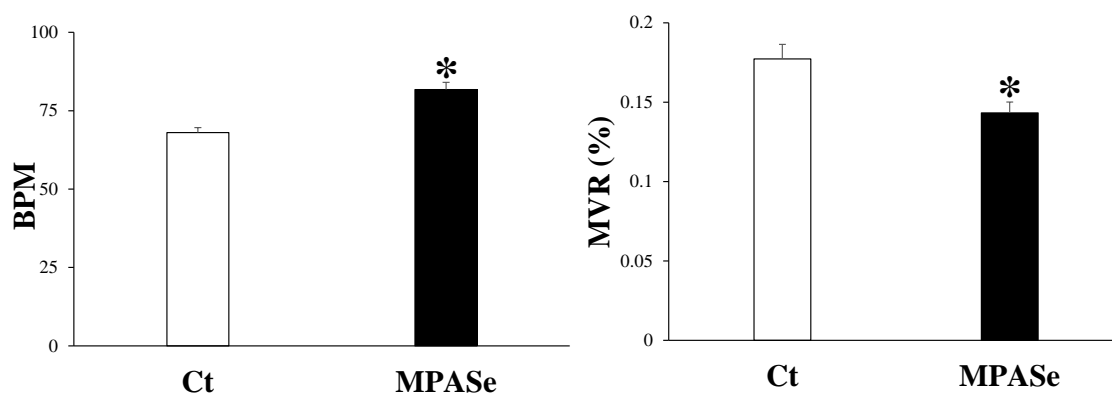
Importante mencionar os efeitos de bioacumulação de metais em outros organismos aquáticos expostos por 96 horas ao MPASe (1 g.L^{-1}) como os peixes, fornecendo uma compreensão mais ampla dos impactos do MPASe em ecossistemas aquáticos. Por exemplo, metais como Fe^{56} , Al, Mn, Sn, Zn e Ti foram bioacumulados em diferentes tecidos como o miocárdio ventricular e eritrócitos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Adorno *et al.*, 2023). Na mesma espécie, foram registrados aumento nos níveis de cortisol e glicose no sangue indicando uma resposta típica ao estresse, além de efeitos negativos na atividade imunológica, no desempenho natatório, fatores que podem comprometer a migração, o crescimento e a reprodução e a resistência à hipoxia ambiental (De Angelis *et al.*, 2022; Soares *et al.*, 2022).

Adicionalmente, a bioacumulação de metais como Ti, Fe^{56} , V, Ba, Mn, Cr, Zn, Rb, Sr, também foi registrada em tecidos como brânquias, hepatopâncreas e fígado de robalo-peva, *Centropomus parallelus*, expostos por 96 horas a 1 g.L^{-1} de MPASe (Monteiro *et al.*, 2023 a,b). Nesse cenário, a bioconcentração de metais em peixes representa riscos significativos para a saúde humana por meio da ingestão e também é um risco para a biota aquática (Fortes *et al.*, 2023).

Os valores médios da frequência cardíaca e da MVR dos grupos Ct e MPASe ($n=12$) são apresentadas na Figura 21. A frequência cardíaca *in loco* (bpm) dos animais do grupo MPASe (81.76 ± 2.30) foi maior ($p < 0,05$) do que a observada para os girinos do grupo controle (68.00 ± 1.62), mostrando um aumento da frequência cardíaca em 28% (Figura 21A). A MVR dos animais do grupo MPASe (0.143 ± 0.006) foi menor ($p < 0,05$) do que a observada para os girinos do grupo controle (0.177 ± 0.009) indicando uma redução de aproximadamente 19% na massa ventricular relativa dos girinos do grupo exposto (Figura 21B).

Esses resultados indicam que a exposição a mistura metálica do MPASe pode desencadear alterações na função cardíaca, como a taquicardia (cronotropismo positivo), além de danos morfológicos e estruturais no miocárdio incluindo lesões, provavelmente relacionados ao acúmulo de metais como o Ti, Fe⁵⁶, Ba, Mn.

Figura 21- (A) Frequência cardíaca (bpm) e (B) Massa ventricular relativa (MVR) no tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe.



Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados pelo teste T. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

A redução observada na MVR pode indicar o desenvolvimento de doenças cardiomiopáticas como a ferroptose, na qual os cardiomiócitos podem ter sofrido atrofia ou remodelação estrutural devido ao acúmulo de ferro. Embora, o Fe seja essencial para a sobrevivência e homeostase da função cardíaca (Valko, Morris e Cronin, 2005), em níveis elevados ele tem sido associado a danos cardíacos e desenvolvimento de doenças como arritmias. A ferroptose é indutora de morte celular devido ao excesso de ferro intracelular, o acúmulo excessivo de ferro pode causar danos por meio da geração excessiva de EROs, que pode levar ao aumento da morte celular cardíaca e alterações estruturais (Shen *et al.*, 2024).

Costa *et al.* (2018) relataram uma diminuição significativa na frequência cardíaca (bradicardia) de *A. catesbeiana* após a exposição ao surfactante aniônico alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) a uma concentração ambientalmente relevante ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) por 96 horas, indicando alterações na função cardíaca. A frequência cardíaca é diretamente dependente da taxa de auto-despolarização das células marcapasso, que são responsáveis pela iniciação e regulação do impulso cardíaco (Salla *et al.*, 2015, 2017).

Esses resultados demonstram a notável plasticidade do tecido cardíaco da espécie *A. catesbeiana*, visto que diferentes estressores ambientais, induzem efeitos distintos sobre o cronotropismo. Em exposições a xenobióticos o aumento da frequência cardíaca é interpretado como uma estratégia de compensar o aumento da demanda energética desencadeada como

resposta ao estressor (Garcia, 2018) o que corrobora os resultados observados no presente estudo.

Em contraste a espécie *Oreochromis niloticus* exposta por 96 horas ao MPASe (1,0 g.L⁻¹) apresentou redução significativa da frequência cardíaca em cerca de 14%, enquanto nossos estudos mostraram um aumento de cerca de 28%, sugerindo maior demanda metabólica ou estresse cardiovascular frente a exposição a mistura metálica. Essa diferença pode ser relacionada às características distintas entre as espécies, como a estrutura cardíaca, processo de oxigenação, adaptações evolutivas (Johansen, 1965) ou à magnitude dos danos causados pelo acúmulo dos metais.

A Figura 22, apresenta os valores médios da força de contração (Fc) (Figura 22A), da capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) (Figura 22B), da taxa de contração (Figura 22C) e da taxa de relaxamento (Figura 22D) das tiras ventriculares de girinos de rã-touro dos grupos controle (Ct) e exposto (MPASe). As tiras foram submetidas a incrementos sucessivos de 0,2 Hz (ou 12 bpm) na frequência de estimulação.

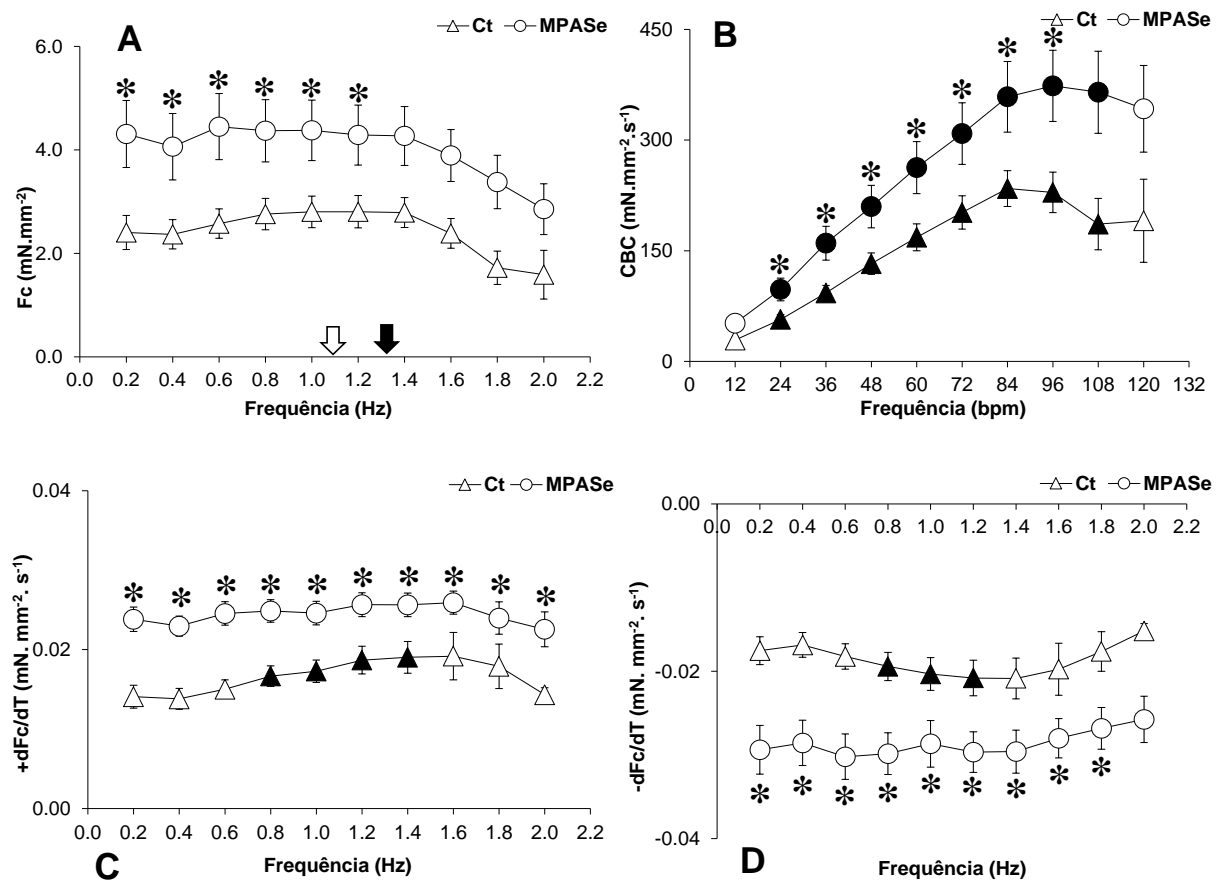
Os resultados revelam que a Fc (Figura 22A) no grupo Ct mostrou-se estável em relação aos valores de 0,2 Hz ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica. Similarmente, no grupo MPASe, a Fc se manteve constante em relação aos valores de 0,2 Hz, ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica. Os valores de Fc desenvolvidas pelas tiras ventriculares do grupo MPASe foram significativamente maiores (~60%) entre 0,2 Hz à 1,6 Hz em comparação aos valores observados no grupo Ct ($p < 0.05$).

A CBC (Figura 22B) no grupo Ct apresentou aumento significativo a partir de 24 bpm em relação aos valores iniciais em 12 bpm. O valor máximo atingido no grupo Ct foi de $229,11 \pm 27,45 \text{ mN mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em 96 bpm. No grupo MPASe, o valor da CBC apresentou uma elevação significativa a partir de 24 bpm, em relação aos valores iniciais, chegando ao valor máximo de $373,60 \pm 48,32 \text{ mN mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em 96 bpm. Adicionalmente, o grupo MPASe exibiu maiores (66%) valores de CBC a partir de 24 bpm até 96 bpm.

A taxa de contração (Figura 22C) no grupo Ct apresentou um aumento significativo a partir de 0,8 Hz até 1,4 Hz. No grupo MPASe, essa taxa se manteve constante em relação aos valores de 0,2 Hz ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica. Os valores da taxa de contração foram significativamente maiores (~50%) no grupo MPASe em relação ao grupo Ct, em todas as frequências de estimulação elétrica testadas.

A taxa de relaxamento (Figura 22D), no grupo Ct apresentou um aumento significativo nas frequências de 0,8 Hz até 1,2 Hz, em relação aos valores observados em 0,2 Hz. Entretanto, no grupo MPASe, a taxa se manteve constante em relação aos valores de 0,2 Hz, ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica. Os valores da taxa de relaxamento foram significativamente maiores (~55%) no grupo MPASe em relação ao grupo Ct, em todas as frequências de estimulação elétrica testadas.

Figura 22- (A) Força de contração (Fc), (B) Capacidade de Bombeamento Cardíaco (CBC), (C) taxa de contração, (D) taxa de relaxamento das tiras ventriculares de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe.



Os valores são média \pm E.P.M. Símbolos preenchidos \blacktriangle \bullet indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz ($p < 0,05$) no mesmo grupo experimental comparados pela ANOVA de medidas repetidas complementada pelo teste de Dunnett de comparações múltiplas. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma frequência comparando os grupos experimentais pelo test-t de *Student*. **Fonte:** a autora.

A exposição ao MPASe desencadeou respostas típicas de estresse na função cardíaca de girinos de rã-touro. A exposição ao MPASe induziu um efeito inotrópico positivo, com o aumento da força de contração e da capacidade de bombeamento cardíaco, além do efeito

lusitrópico positivo decorrente da maior taxa de relaxamento nas tiras isoladas do ventrículo cardíaco.

Essas ações podem ter sido desencadeadas pela liberação de catecolaminas incluindo, noradrenalina e adrenalina (Miyakawa, Arai e Kikuyama, 1982). Em situações de estresse as catecolaminas se ligam aos receptores β adrenérgicos do miocárdio ventricular aumentando a força de contração (Silva e Zanesco, 2010). Essa ligação ativa a adenilato ciclase gerando adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), o qual ativa a proteína quinase a (PKA), que por sua vez, aumenta a disponibilidade de Ca^{2+} (Pinto, Guida-Cardoso e Areas, 2005). A ativação da PKA causa a fosforilação dos canais de Ca^{2+} sarcolemais nos miócitos (Bers, 2001; Fioresi *et al.*, 2013). Essa ativação promove o inotropismo positivo cardíaco (aumento força de contração) (Silva e Zanesco, 2010).

Assim, as mudanças e os estímulos podem influenciar o débito cardíaco, aumentando tanto a força de contração, e, conseqüentemente o volume sistólico, quanto a frequência cardíaca e, a fim de aumentar a capacidade de bombear o sangue (Ferro, 2014). Observou-se na presente pesquisa que o aumento da força de contração ocorreu desde as frequências sub-fisiológicas a supra-fisiológicas, o que sugere que a exposição ao MPASe induz adaptações na contratilidade cardíaca como medida de compensação em resposta ao estresse (Adorno 2021; De Angelis *et al.*, 2023).

Ao avaliar os impactos do MPASe em tilápias-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, Adorno *et al.* (2023) também observou o aumento da força de contração (34%), da taxa de contração (27%) e da taxa de relaxamento (23%) após a exposição por 96 horas a 1 g.L^{-1} do pó preto. Os autores relacionaram esses resultados a liberação de catecolaminas devido ao estresse desencadeado pela exposição a mistura metálica do MPASe.

O presente estudo demonstrou efeitos lusitrópicos positivos evidenciados pelo aumento da taxa de relaxamento do miocárdio de girinos de rã-touro expostos ao MPASe. O relaxamento contrátil está relacionado a remoção de Ca^{+2} do sarcoplasma (Fabiato e Fabiato, 1978; Orchard e Brette, 2007). Em anfíbios, o RS, que em endotérmicos atua como um local rápido de armazenamento e liberação de Ca^{+2} , apresenta funcionalidade limitada, ou é considerado pouco desenvolvido (Tijskens, Meissner e Franzini-Armstrong, 2003).

Na maioria das espécies ectodérmicas, como os anfíbios, as contrações dos miócitos atriais e ventriculares não dependem da liberação de Ca^{2+} do RS (Oliveira e Pizzaro, 2018). A contração é sustentada pelo fluxo transsarcolemal de Ca^{2+} através de canais tipo L (LTCCs) e,

por contribuição do trocador NCX de modo reverso durante a despolarização (Shields e Galli, 2014). No modo reverso, o NCX é um importante regulador do influxo de Ca^{2+} na contratilidade cardíaca transportando um íon Ca^{2+} para o meio intracelular e 3 íons Na^+ para o meio extracelular (Shuba *et al.*, 1998). O trocador NCX também desempenha papel proeminente no relaxamento do coração facilitando a saída de Ca^{2+} (Orchard & Brette, 2007; Shemarova *et al.*, 2008).

Quando o NaCl é substituído pelo LiCl na solução fisiológica, a atividade do trocador NCX é bloqueada, comprometendo o influxo e o efluxo de Ca^{2+} (Ferro, 2014; Smith e Allen, 1988). Esse bloqueio pode afetar diretamente a resposta contrátil miocárdica das tiras ventriculares dos girinos de rã-touro. A Figura 23 ilustra os efeitos dos incrementos na estimulação elétrica na contratilidade miocárdica dessas tiras comparando as condições anteriores (Ct e MPASe) e após a substituição da solução fisiológica pela solução contendo LiCl (Ct+Li e MPASe +Li).

A Fc exibida pelo grupo Ct+Li apresentou uma redução significativa em relação aos valores iniciais obtidos em 0,2 Hz (Figura 23 A). A Fc no grupo Ct manteve contrações regulares em todas as frequências de estimulação (Figura 23 A). Em média, a Fc do grupo Ct+Li foi 28% menor, que o grupo Ct em todas as frequências avaliadas. No grupo MPASe+Li a Fc mostrou diminuição significativa a partir da frequência 0,8 Hz ou 48 bpm (Figura 23 B). No grupo MPASe não foram observadas alterações significativas na Fc ao longo do incremento da estimulação elétrica (Figura 23 B). Comparativamente entre os grupos, a Fc do grupo MPASe+Li foi significativamente menor (49%) que aquela registrada para o grupo MPASe

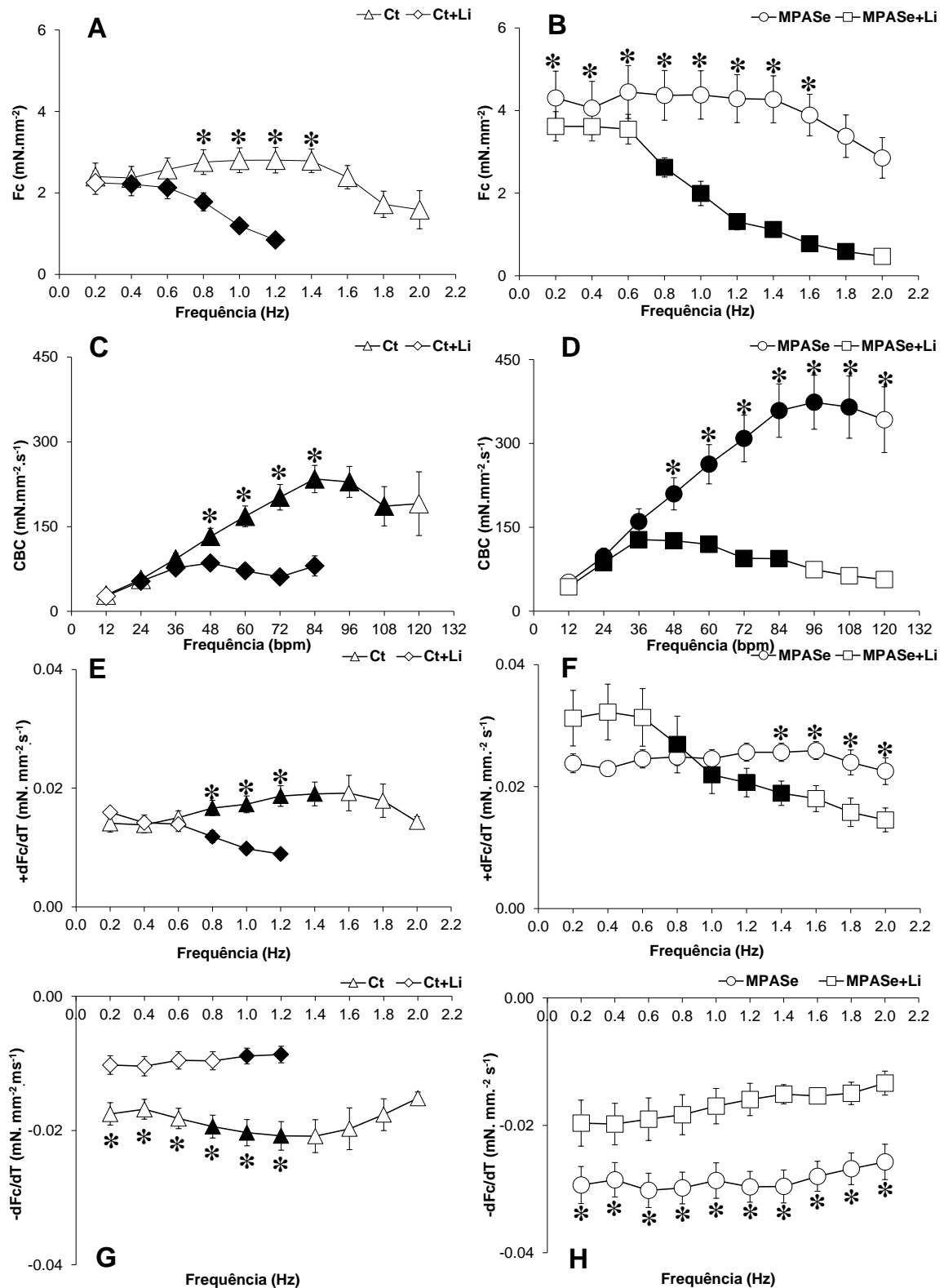
Em relação a CBC, no grupo Ct+Li foi observado um aumento significativo a partir de 24 bpm até 84 bpm quando comparado aos valores iniciais de 12 bpm (Figura 23 C). No grupo Ct ocorreu um aumento significativo a partir de 36 bpm até 84 bpm. A CBC do grupo Ct+Li diminuiu cerca de 58% comparada ao grupo Ct. No grupo MPASe+Li o valor obtido da CBC apresentou elevação significativa até 84 bpm, comparado aos valores iniciais (Figura 23 D). No grupo MPASe, os valores da CBC apresentaram uma elevação significativa a partir de 24 bpm a 108 bpm comparado aos valores iniciais de 12 bpm (23D). Adicionalmente entre os grupos foi observado uma diminuição de 58% do grupo MPASe+Li em relação ao grupo MPASe.

Os valores da taxa de contração do grupo Ct+Li apresentaram uma redução significativa a partir de 0,8 Hz em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz (Figura 23 E). No grupo Ct foi observado um incremento significativo a partir de 0,8 Hz até 1,4 Hz em relação

aos valores obtidos em 0,2 Hz (Figura 23 E). Em média, a taxa de contração do grupo Ct+Li foi 25% menor que o grupo Ct em todas as frequências avaliadas. No grupo MPASe+Li, a taxa de contração apresentou diminuição significativa a partir de 0,8 Hz até 1,4 Hz em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz (Figura 23 F). No grupo MPASe, essa taxa se manteve constante em relação aos valores de 0,2 Hz ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica (Figura 23 F). Adicionalmente, entre os grupos, observou-se uma redução de 4% no grupo MPASe+Li em comparação ao grupo MPASe.

Quanto a taxa de relaxamento, o grupo Ct+Li apresentou aumento significativo nas frequências 0,8 Hz até 1,2 Hz em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz. No grupo Ct ocorreu um aumento significativo nas frequências de 1,0 Hz e 1,2 Hz, em relação aos valores de 0,2 Hz, ao decorrer dos incrementos de estimulação elétrica (Figura 23 G). Em média, a taxa de relaxamento do grupo Ct+Li foi 47% menor, que o grupo Ct em todas as frequências avaliadas (Figura 23 G). No grupo MPASe+Li, essa taxa se manteve constante em relação aos valores registrados em 0,2 Hz (Figura 23H). No grupo MPASe, a taxa de relaxamento não apresentou alteração em relação aos valores observados em 0,2 Hz (Figura 23H). Adicionalmente entre os grupos foi observado uma diminuição de 40% nos valores da taxa de relaxamento do grupo MPASe+Li em relação ao grupo MPASe.

Figura 23- (A, B) Força de contração, (C, D) Capacidade de bombeamento cardíaco, (E, F) taxa de contração, (G, H) taxa de relaxamento das tiras ventriculares de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct / Ct+Li e MPASe/MPASe + Li (n = 12).



Os valores são média \pm E.P.M. Os símbolos preenchidos \blacktriangle \blacklozenge \bullet \blacksquare indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em 0,2 Hz ($p < 0,05$) no mesmo grupo experimental comparados pela ANOVA de medidas repetidas complementada pelo teste de Dunnet de comparações múltiplas. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma frequência comparando os grupos experimentais pelo test-t de *Student*. **Fonte:** a autora.

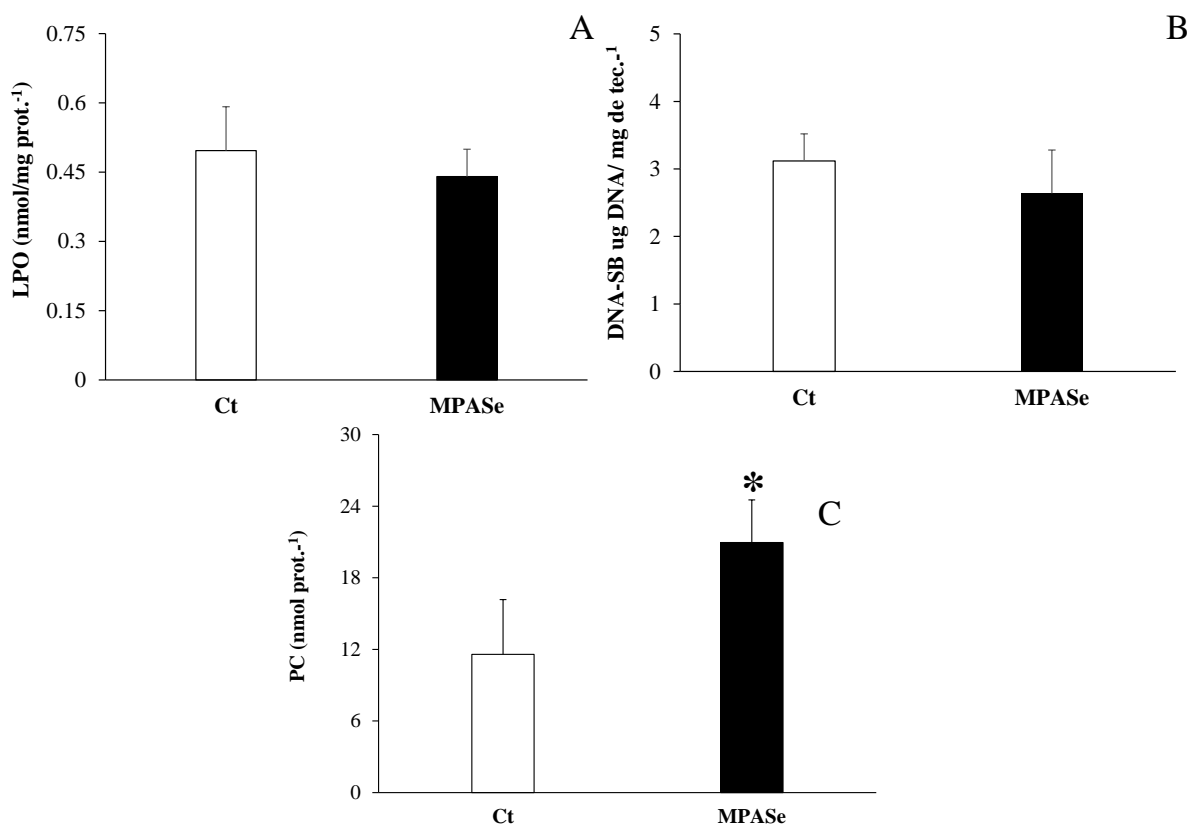
Esses resultados demonstram a grande relevância do NCX no modo reverso como fornecedor de Ca^{+2} ativando os miofilamentos, e no modo normal ao promover o relaxamento cardíaco por meio da extrusão de Ca^{+2} (Bers, 2001). Estudos realizados em espécies de anfíbios como *Rhinella ictérica* (Salla, 2017) e *Rana temporária* (Lüttgau; Niedergerke, 1958) demonstram a ocorrência de inotropismo negativo como resposta a adição de LiCl, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Esses resultados indicam uma grande relevância do NCX como fonte extracelular de cálcio para a contração cardíaca no acoplamento E-C de anfíbios (Salla, 2017).

Quanto aos biomarcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de LPO entre os grupos Ct e MPASe (Fig. 24A). No fígado e nos rins de girinos de rã-touro expostos a 1 g.L^{-1} de MPASe também não foi observada diferença significativa nos níveis desse biomarcador de estresse oxidativo (Fernandes *et al.*, 2024). Os autores descreveram que somente no músculo ocorreu aumento de cerca de 89% nos níveis de LPO evidenciada pelo aumento de malondialdeído (MDA) em cerca de 35%. A exposição por 96 horas ao MPASe (1 g.L^{-1}) resultou em menores níveis de LPO no hepatopâncreas do peixe robalo-peva, *Centropomus parralelus*, comparado ao grupo controle, indicando que mecanismos regulatórios como a presença de proteínas de ligação de ferro podem ter auxiliado no controle dos níveis de EROs prevenindo a peroxidação lipídica (Monteiro *et al.*, 2023 a, b).

No tecido cardíaco, os resultados da análise de DNA-SB não revelaram diferença significativa entre os grupos Ct e MPASe (Fig. 24B), indicando que a exposição ao MPASe não induziu danos detectáveis ao DNA das células cardíacas. Esse resultado indica que tecido cardíaco pode ter apresentado mecanismos eficazes de reparo ou até mesmo de resistência, capazes de mitigar ou minimizar os potenciais efeitos genotóxicos associados a exposição ao MPASe.

A quantificação da PC (Fig. 24C) nos animais do grupo MPASe (20.95 ± 3.57) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o observado nos girinos do grupo Ct (11.58 ± 4.59). Esse aumento e aproximadamente 80% nos níveis de PC indica que a exposição ao MPASe desencadeou aumento nos níveis de oxidação nas proteínas do músculo cardíaco. Esse resultado é um indicador direto de estresse oxidativo nas células e acúmulo de danos oxidativos nessas moléculas comprometendo a estrutura e função cardíaca, uma vez que as proteínas são alvos primários dos íons de metais (Lushchak, 2011; Reznick e Packer, 1994; Sharma *et al.*, 2011).

Figura 24- (A) Níveis de lipoperoxidação (LPO), (B) DNA Strand-break (DNA-SB) (B), (C) Proteína carbonilada do tecido cardíaco de girinos de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) dos grupos Ct e MPASe (n = 12).



Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados pelo test-t de *Student*. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

A oxidação mediada por metais pode levar a formação de grupos carbonila em proteínas. Por exemplo, o Fe pode se ligar às proteínas e facilitar a oxidação das cadeias laterais de aminoácidos, convertendo-as em derivados carbonílicos (Fedorova, Bollineni e Hoffmann, 2014; Reznick e Packer, 1994). Os resultados desse estudo revelaram concentrações elevadas de Fe no tecido cardíaco. Embora, seja um metal essencial no metabolismo, concentrações excessivas podem catalizar a formação de EROs, criando um ambiente que propicia alterações estruturais e funcionais em proteínas (Ranjitha e Sharath Chandra, 2020).

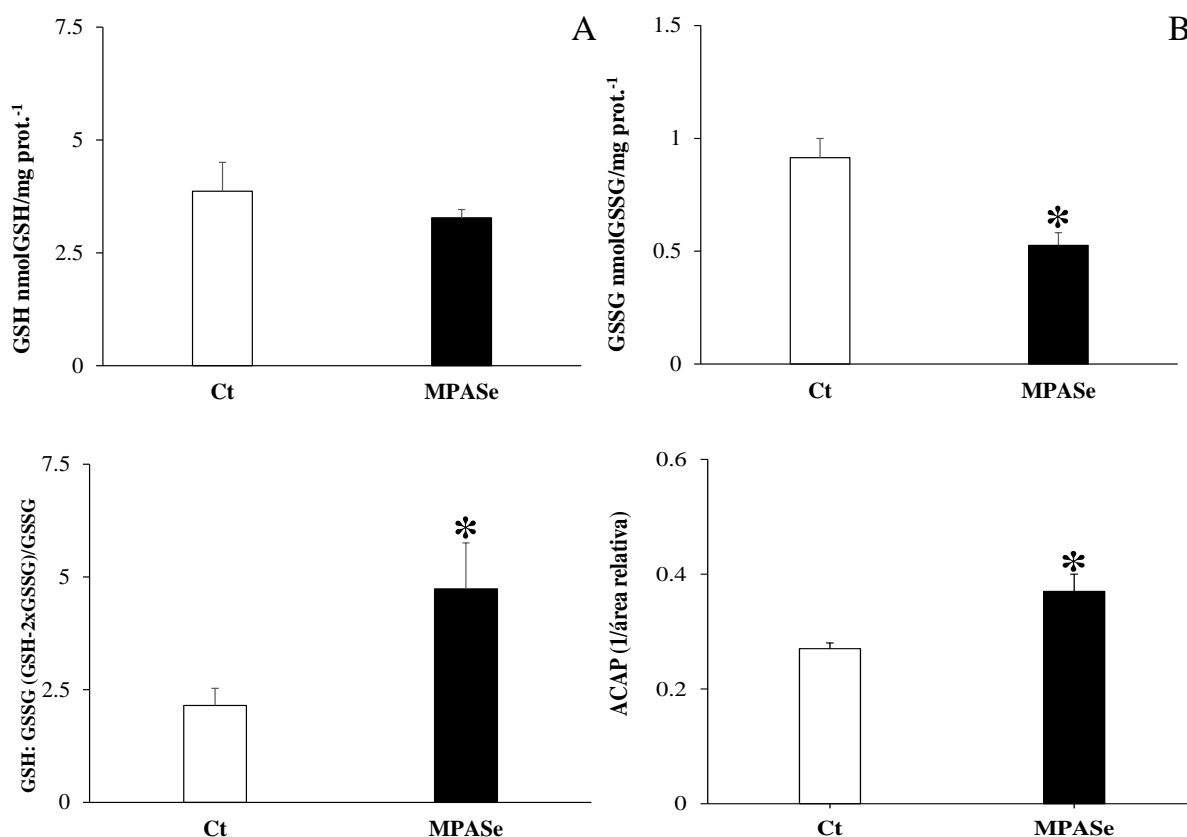
Informações significativas sobre os níveis de PC são apresentados por Fernandes *et al.*, (2024) que, em condições laboratoriais, observaram em girinos de rã-touro expostos MPASe (1 g.L^{-1} durante 96 horas) um aumento substancial de PC em órgãos como fígado (68%) e cérebro (85%). Em conjunto, esses resultados demonstram que a magnitude dos danos oxidativos induzidos pela exposição ao MPASe pode mudar entre diferentes tecidos. Dessa forma, a

exposição ao MPASe pode levar ao comprometimento da saúde dos animais, pois adicionalmente foram encontrados altos níveis de metais como Fe⁵⁶, Zn, Al no miocárdio ventricular. Monteiro *et al.* (2023b), também observaram um aumento nos níveis de PC no hepatopâncreas do peixe robalo-peva exposto ao MPASe (1 g.L⁻¹ durante 96 horas). Em outra espécie de peixe, *Oreochromis niloticus*, altos níveis de PC foram encontradas no plasma (39%) e nos eritrócitos (135%) após exposição de MPASe na concentração de 1 g. L⁻¹ durante 96 horas. No sangue foram encontradas altas concentrações de Fe⁵⁶, Sn, Zn (Adorno *et al.*, 2023).

A Figura 25 apresenta os valores médios de GSH, GSSG, da razão GSH:GSSG e da ACAP no coração para os grupos Ct e MPASe. No tecido cardíaco não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis de GSH entre os grupos Ct e MPASe (Figura 25 A). Por outro lado, os valores médios de GSSG do grupo exposto MPASe foram cerca de 42% inferiores ao grupo controle (Figura 25 B). O valor médio de GSSG do grupo controle foi de $0,91 \pm 0,08$ nmol GSSG.mg prot⁻¹ e do grupo exposto MPASe foi de $0,52 \pm 0,05$ nmol GSSG.mg prot⁻¹. A razão GSH:GSSG dos animais do grupo MPASe ($4,73 \pm 1,01$), foi significativamente maior (121%), do que a observado para os girinos do grupo controle ($2,14 \pm 0,38$), observados na Figura 25 C. Os valores médios da ACAP dos grupos Ct e MPASe (n=12) são apresentados na Figura 25 D. Os valores da ACAP do grupo MPASe ($0,37 \pm 0,03$), foram significativamente maiores (37%), em relação àqueles observados para os girinos do grupo Ct ($0,27 \pm 0,01$).

Esses achados reforçam a importância de investigar os mecanismos envolvidos na resposta do estresse oxidativo induzido pela exposição ao MPASe. Nesse contexto, os mecanismos antioxidantes não enzimático compostos pela GSH e a GSSG são importantes na manutenção do equilíbrio redox (Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020). A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a oxidação de GSH à GSSG (Carlberg e Mannervik, 1985; Huber, Almeida e Fátima, 2008). A glutathione reductase (GR) é uma flavoproteína que catalisa a redução da GSSG à sua forma reduzida (GSH), utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como doador de elétrons (Carlberg e Mannervik, 1985; Shan, Aw e Jones, 1990). O valor da razão GSH:GSSH é utilizada como um indicador do estado redox celular, porque determina a capacidade antioxidante das células (Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020).

Figura 25- (A) Níveis de glutathiona reduzida (GSH), (B) Níveis de glutathiona oxidada (GSSG), (C) razão GSH:GSSG (D) Capacidade Antioxidante Total de (*Aquarana catesbeiana*) do tecido cardíaco de girinos de rã-touro dos grupos Ct e MPASe (n = 12).



Os valores são média \pm E.P.M. Os grupos foram comparados pelo test-t de Student. * indica diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

A GSH é composta por três aminoácidos, a glicina, cisteína e glutamato e desempenha participação no metabolismo dos xenobióticos incluindo a biotransformação, a eliminação de EROs (Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020; Sadiq *et al.*, 2016) e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Huber, Almeida e Fátima, 2008).

O esgotamento da GSH pode ocorrer por meio da exposição a metais tóxicos, os quais induzem estresse oxidativo severo ao interferirem no ciclo redox. Isso limita a capacidade biológica de combater os danos causados pelas EROs, além de prejudicar a regeneração de GSH mediada pela GR (Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020). No entanto, os níveis de GSH no tecido cardíaco de girinos de rã-touro não apresentaram diferenças entre os grupos Ct e MPASe que pode demonstrar a presença de mecanismos adaptativos e compensatórios em resposta ao estresse oxidativo.

Após 48 horas de exposição as seguintes misturas metálicas Zn e Cu ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), e Zn e Cd ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), girinos de rã-touro apresentaram uma redução de 20-35% nos níveis de GSH

no fígado, o que indica uma menor proteção nesse tecido em relação aos danos provocados por metais (Carvalho *et al.*, 2020). Tecidos expostos a íons metálicos podem apresentar o nível de GSH diminuído por duas razões: o aumento da eficiência dos processos oxidantes nas células pelo aumento da geração de EROs e/ou a limitação da disponibilidade de cisteína, que é um precursor limitante da taxa de síntese de novas moléculas de glutathiona (Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020).

Adorno *et al.* (2023) encontraram níveis diminuídos de GSH no sangue de tilápias-do-Nilo após 96 horas de exposição ao MPASe a 1 g.L^{-1} , indicando a tentativa de impedir a produção de EROs ou simplesmente a ineficácia de regeneração da GSH. Entretanto, os níveis de GSH em robalo-peva permaneceram inalterados no hepatopâncreas, após 96 horas de exposição a mesma concentração de MPASe, o que pode demonstrar que as vias de biotransformação nesse órgão podem não ter sido ativadas para facilitar a excreção de metais (Monteiro *et al.*, 2023b).

Os níveis de GSSG no tecido cardíaco de girinos de rã-touro foram significativamente reduzidos após a exposição ao MPASe. Em condições normais, o conteúdo do GSSG é limitado em níveis muito baixos em comparação com GSH, graças a ação eficiente da GR, que está acoplado ao sistema $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Shan, Aw e Jones, 1990). Esse sistema é essencial para o equilíbrio redox e proteção celular.

Com a redução dos níveis de GSSG no coração dos girinos expostos ao MPASe, houve um aumento nos níveis da razão $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$. Essa relação é considerada um indicador sensível de estresse oxidativo (Kidd, 1997; Sadiq *et al.*, 2016). A relação GSH/GSSG muda conforme a necessidade funcional de cada compartimento celular. Em mitocôndrias essa relação é normalmente alta comparada com os demais compartimentos celulares, pois durante as atividades mitocondriais de fosforilação oxidativa ocorre grande produção de EROs. O ambiente redutor ajuda a controlar e neutralizar o fluxo elevado de EROs, protegendo as mitocôndrias do estresse oxidativo ajustando o ambiente celular de acordo com as necessidades bioquímicas (Kidd, 1997).

O tecido cardíaco apresenta uma grande quantidade de mitocôndrias e proteínas corroborando com os resultados apresentados no presente estudo. Kaczor-Kamińska; Sura e Wróbel, 2020 encontraram níveis aumentados da razão $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$ em anfíbios, em tecido como fígado, rins e testículos após a exposição ao Cd (40 mg/L) durante 10 dias.

AACAP fornece uma avaliação da funcionalidade dos mecanismos de defesa presentes no tecido cardíaco ativados em resposta ao estresse oxidativo. De acordo com Amado *et al.* (2009) a análise ACAP envolve uma avaliação integrada de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione reduzida, glutathione peroxidase, etc.) e não enzimáticos (glutathione, α -tocoferol e β -caroteno). Os resultados da ACAP foram expressos com os valores do inverso da área relativa, desse modo valores mais altos de formação de EROs indicam uma maior capacidade antioxidante de defesa (Klein *et al.*, 2017).

O tecido cardíaco apresentou uma variedade de mecanismos de defesa e estratégias para neutralizar os efeitos das EROs, inclusive impedindo aumentos nos níveis de peroxidação lipídica e danos no DNA. Entretanto, essas estratégias podem não ter sido suficientes para conter os danos oxidativos, pois foram registrados aumento nos níveis de proteínas carboniladas, o que pode levar à perda da funcionalidade das proteínas e disfunção celular.

O Cr é descrito por Ghasemi, Rostampour e Ranjbar (2014) como um metal conhecido por desencadear disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. No estado Cr (IV) pode mediar a formação de radicais peroxila (HO) quando reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse metal, é descrito como um redutor da funcionalidade de proteínas mitocondriais, além de desencadear a apoptose celular e a depleção da glutathione (Valko, Morris e Cronin, 2005). No presente estudo, ocorreu a acumulação desse importante metal no tecido cardíaco de girinos expostos ao MPASe, o que pode ter contribuído para a indução da carbonilação de proteínas e estresse oxidativo.

Adicionalmente, nos girinos expostos ao MPASe ocorreu a bioconcentração do metal Ti, que é descrito por sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e ser distribuído sistematicamente pelos compartimentos do organismo (Huerta-Garcia *et al.*, 2015). Esse metal pode provocar danos celulares ao interagir com componentes do plasma sanguíneo como as proteínas, promovendo efeitos tóxicos sinérgicos (Chang *et al.*, 2020). Efeitos genotóxicos, morfológicos e comportamentais foram observados em anfíbios após a exposição as nanopartículas de TiO_2 (Do Amaral *et al.*, 2022).

Ribeiro *et al.* (2015, 2017) mostraram que as espécies de peixes *Myloplus rubripinnis* e *Cichla melaniae*, vivendo em ambientes contaminados por metais (As e Hg na água e Cr e Ni no sedimento) oriundos de atividades como garimpo, agropecuária, e indústrias, apresentaram ativação de sistema de defesa antioxidante em tecidos como fígado, brânquias e músculo. Ocorreu um aumento nos níveis de ACAP durante o período de estiagem, o que torna os animais

mais susceptíveis a doenças. Os metais analisados apresentam grande afinidade com lipídios além de serem constituintes de tecidos biológicos. Cantanhêde *et al.* (2022) relataram alta eficiência da ACAP das brânquias do peixe *Bryconops caudomaculatus*, após exposição aguda ao alumínio ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 48 horas), indicando um meio de fornecer proteção eficaz contra a exposição que também pode ter prevenido a peroxidação lipídica nesse tecido.

Os efeitos subletais da exposição de anfíbios a concentrações de diferentes tipos de metais isolados ou em misturas metálicas abrangem efeitos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos, neurotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos. Essas condições afetam a atividade fisiológica dos anfíbios, impactando na saúde ambiental, bem como na diversidade populacional (Benvindo-Souza *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2024; Dal-Medico *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2021; Veronez *et al.*, 2016).

3.5 Conclusão

A exposição ao MPASe induziu alterações significativas no tecido cardíaco, evidenciadas por meio da bioconcentração de metais e metaloides. O aumento na frequência cardíaca (bpm), acompanhada da diminuição da massa ventricular relativa (MRV), causados pelo MPASe indicam uma resposta compensatória ao estresse e possíveis lesões associadas a danos estruturais no coração.

O cronotropismo positivo foi acompanhado pelo inotropismo e lusitropismo positivos, caracterizados por aumento da força e da taxa de relaxamento. Esses ajustes ocorreram como uma tentativa de manter o débito cardíaco e a perfusão tecidual adequada diante da exposição à mistura de múltiplos metais. No entanto, devido ao maior consumo de energia, esses mecanismos comprometem a disponibilidade de recursos para atividades essenciais, como busca de alimento e natação.

O NCX desempenha um papel crucial no acoplamento excitação-contração (E-C) dos girinos, facilitando tanto o influxo de Ca^{2+} durante a despolarização quanto o relaxamento, por meio do efluxo de Ca^{2+} . Esses processos ocorrem de forma independente da exposição ao MPASe, evidenciando a importância do NCX na regulação da dinâmica do cálcio no músculo.

O MPASe causou estresse oxidativo no tecido cardíaco evidenciado por aumentos nos níveis de proteína carbonilada, além da ativação do sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático, como o aumento na razão GSH:GSSG e dos níveis de ACAP. Esses resultados indicam uma resposta adaptativa do organismo ao estresse induzido pelo MPASe,

refletindo a tentativa de mitigar os danos causados pela geração de EROs induzida pelos metais nas células cardíacas. No entanto, essa resposta não foi suficiente para impedir os danos oxidativos no miocárdio ventricular.

A rã-touro, possui plasticidade ambiental que lhe permite realizar os ajustes necessários para sua sobrevivência aos efeitos da exposição ao MPASe, embora à custa de um aumento no gasto energético. Esses efeitos podem ser ainda mais prejudiciais para as espécies nativas de anfíbios, que demonstram maior sensibilidade aos contaminantes, ressaltando a importância de medidas de proteção e conservação.

4 CAPÍTULO IV
CONCUSÃO GERAL

4. CONCLUSÃO GERAL

O MPASe de origem metalúrgica é constituído por diferentes metais e metaloides, que ao serem dissociados no ambiente aquático, tornam-se biodisponíveis para a biota residente, inclusive os anfíbios durante o estágio larval. A biodisponibilidade facilita a absorção dos componentes metálicos do MPASe permitindo a internalização, acumulação no sangue e no tecido cardíaco.

A exposição de girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*) no estágio 25 de Gosner, ao MPASe provocou uma série de alterações no sangue, incluindo anormalidades nucleares eritrocitárias, somadas a maior fragmentação do material genético nas células sanguíneas, demonstrando efeitos mutagênicos e genotóxicos. Somados a esses impactos estão a redução do crescimento, o aumento no índice hepatossomático e na concentração de hemoglobina, indicando efeitos tóxicos mesmo em níveis subletais.

No tecido cardíaco, a exposição induziu ajustes no débito cardíaco, por meio do aumento da frequência cardíaca e contratilidade miocárdica, evidenciada pelo aumento na força de contração, na taxa de contração e relaxamento e na capacidade de bombeamento cardíaco. Entretanto, essa remodelação da função cardíaca foi acompanhada de dano no miocárdio apontado por diminuição da massa ventricular relativa. A exposição induziu o estresse oxidativo, evidenciado por danos nas proteínas presentes nas células cardíacas.

Esses achados indicam que os impactos da exposição da mistura metálica do MPASe em girinos de rã-touro (*A. catesbeiana*), são significativos devido as alterações observadas no sangue e no músculo cardíaco, e podem comprometer a homeostase fisiológica, mesmo em exposição de curta duração e em concentração subletal, sendo uma potencial ameaça à conservação dos anfíbios, reforçando a necessidade do monitoramento desse contaminante metálico de origem industrial.

Algumas limitações da presente pesquisa precisam ser consideradas uma vez que a avaliação foi centrada na exposição aguda, sendo essenciais novos trabalhos que investiguem as consequências da exposição crônica em anfíbios. Uma análise populacional com espécies nativas permitiria uma abrangente compreensão a longo prazo, o que seria fundamental para uma avaliação mais ampla e com maior robustez sobre os riscos ambientais. Portanto, são necessários maiores estudos que consigam preencher essa lacuna.

Esse estudo apresenta subsídios científicos para a formulação de políticas públicas ambientais mais rigorosas, principalmente na Região Metropolitana da Grande Vitória, devido à grande ocorrência de atividades siderúrgicas e metalúrgicas. Adicionalmente, a adoção desse

conjunto de medidas pode servir como um mecanismo de proteção e conservação da biodiversidade, com destaque para os anfíbios, que a nível mundial são considerados os vertebrados mais ameaçados de extinção.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, W. *et al.* Bioavailability assessment of metals in freshwater environments: A historical review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 48-59, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4558>. Disponível em: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.4558>. Acesso em: 21 ago. 2024.

ADORNO, H.A. **Efeito do material particulado atmosférico (MPA) sedimentável proveniente da atividade siderúrgica sobre a função cardíaca de tilápia, *Oreochromis niloticus***. Orientadora: Diana Amaral Monteiro. 2021. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

ADORNO, H.A. *et al.* A multi-biomarker approach to assess the sublethal effects of settleable atmospheric particulate matter from an industrial area on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 856, p. 159168. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969722062672?via%3Dihub>. Acesso em: 20 dez. 2022.

AFONSO, L. G. *et al.* Reprodução da exótica rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Amphibia, Anura, Ranidae) em riachos de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n.3, p. 85-91, 2010. DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n3p85>. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2010v23n3p85>. Acesso em: 21 ago. 2024.

AKMENTINS, M. S.; CARDOZO, D. E. American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. **Biological Invasions**, Campinas, v. 12, p. 735-737, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9515-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10530-009-9515-3>. Acesso em: 11 ago. 2023.

ALIMBA, C.G. *et al.* Micronucleus cytome assay in the differential assessment of cytotoxicity and genotoxicity of cadmium and lead in *Amietophrynus regularis*. **JXCLI J**, [s.l.], v. 17, p. 89–10, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2017-887>. Disponível em: https://www.excli.de/vol17/Alimba_11012018_proof.pdf. Acesso em: 20 jul. 2023.

ALROY, J. Current extinction rates of reptiles and amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 42, p. 13003–13008, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26438855/>. Acesso em: 21 ago. 2024.

AMADO, L. L. *et al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the total Environment**, [s.l.], v. 407, n. 6, p. 2115-2123, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0048969708011583?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2024.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. (E 729-96. Annual Book of Standards 11 (5), 220–240. Section 11. Philadelphia, PA. 2020. Disponível em:

<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/114558/9eb07676a073442b9817cebbae59e928/ASTM-E729-23e1.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2023.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). Report of the AVMA panel on euthanasia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 218, n. 5, p. 670-696, 2001. DOI: 10.2460/javma.2001.218.669. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11280396/>. Acesso em: 10 jul. 2023.

ANDERSON, M. E. [70] Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1985. p. 548-555. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13073-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/abs/pii/S0076687985130739?via%3Dihub>. Acesso em 01 de dez. 2024.

ARNAUDOV, A.; ARNAUDOVA, D. Erythrocytes and hemoglobin of fish: potential indicators of ecological biomonitoring. In: KARAPEHLIVAN, M.; GELEN, V.; KÜKÜRT, A. (Ed) **TechOpen**. 2022. cap. 8, p. 1-12. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.107053>. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/83519#>. Acesso em: 20 jul. 2023.

AUTHORITY, Sydney Catchment. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand (ANZECC and ARMCANZ). 2000. **Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Waters**. Astles, KL., Winstanley, RK., Harris, JH. and Gehrke, PC, p. 55-69, 2003. Acesso em: 21 ago. 2024.

AVMA - AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 218, n. 5, p. 670-696, 2001. Acesso em: 21 ago. 2024.

AZEVEDO, J.S., BRAGA, E.S., RIBEIRO, C.A.O. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian Coast. **Brazilian Journal Oceanography**, São Paulo, v. 60, n.3, p. 323–330. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjoce/a/585HvcPvQhXCCrjM8hPPzpc/?lang=en>. Acesso em: 20 jul. 2023.

BARNI, S. *et al.* Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 81, p. 45–54, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X06003961>. Acesso em: 10 jul. 2023.

BARRILLI, G.H.C. *et al.* Influence of environmental quality of the tributaries of the Monjolinho River on the relative condition factor (Kn) of the local ichthyofauna. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 15, n. 1, p. e20140107, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1676-06032015010714>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/nRsXyZZqVPTzTfXRwkM8Nfg/abstract/?lang=en>. Acesso em: 10 jul. 2023

BENNETT, M. F.; ALSPAUGH, J. K. Some changes in the blood of frogs following administration of hydrocortisone. **The Virginia Journal of Science**, [s.l.], v. 15, p. 76-79, 1964. Acesso em: 21 ago. 2024.

BENVINDO-SOUZA, M. *et al.* Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, [s.l.], v. 240, p. 124910, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124910>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519321496?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2023.

BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, [s.l.], v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/415198a>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/415198a>. Acesso em: 17 out. 2024.

BERS, D. M. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**. 2 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 237 p., 2001.

BHUYAN, K. *et al.* Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, Dicroglossidae) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 27, p. 20962–20971, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08609-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-020-08609-3>. Acesso em: 13 jul. 2023.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Canadian journal of applied physiology**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 245-263, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1139/h04-017>. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/h04-017>. Acesso em: 13 jul. 2023.

BONOMO, M. M. *et al.* Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 268, p. 115758, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115758>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749120364472>. Acesso em: 13 jul. 2023.

BORGES, R.E. *et al.* Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the central cerrado, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [s.l.], v. 77, p. 22–28, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-019-00623-y>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BOSCHILIA, C. **Manual Compacto de Biologia**. 1. ed. São Paulo: Rideel, 2010. 479 p.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. **Environmental health perspectives**, [s.l.], v. 105, n. suppl 1, p. 21-35, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s121>. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.97105s121>. Acesso em: 10 jul. 2023.

BRAAFLADT, S.; REIPA, V.; ATHA, D. H. The comet assay: automated imaging methods for improved analysis and reproducibility. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 32162, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep32162>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep32162>. Acesso em: 16 jun. 2023.

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**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0003269776905273>. Acesso em: 21 ago. 2024.

BRAHAM, R.P. *et al.* Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the Great Lakes Basin, USA. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 58, n. 8,

p. 570–581, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22123>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28868735/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BRASIL. **Resolução CONAMA n 357 de 17 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. Diário Oficial da União: Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: https://conama.mma.gov.br/?option=com_siskonama&task=arquivo.download&id=450. Acesso em: 20 ago.2024.

BRUM, G.; RIOS, E.; STEFANI, E. Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. **The Journal of physiology**, [s.l.], v. 398, n. 1, p. 441-473, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017052>. Disponível em: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.1988.sp017052>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BURGER, J., SNODGRASS, J. Heavy metals in bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles: Effects of depuration before analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 11, p. 2203–2209, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620171110>. Disponível em: <https://scholarship.libraries.rutgers.edu/esploro/outputs/journalArticle/HEAVY-METALS-IN-BULLFROG-RANA-CATESBEIANA/991031666087904646>. Acesso em: 21 ago. 2024.

BURGGREN W, FARRELL A, LILLYWHITE H. **Vertebrate cardiovascular systems**. Comprehensive physiology. 2010 Jun:215-308.

CAITO, S., ASCHNER, M. Neurotoxicity of metals. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 2015. cap. 11, v. 131, p. 169-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00011-1>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444626271000111>. Acesso em: 25 jul. 2023.

CANTANHÊDE, S. M. *et al.* Evaluation of cardiotoxicity in Amazonian fish *Bryconops caudomaculatus* by acute exposure to aluminium in an acidic environment. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 242, p. 106044, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106044>. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0166445X21003040?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out. 2024.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1985. p. 484-490. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4). Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/abs/pii/S0076687985130624>. Acesso em: 17 out. 2024.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, [s.l.], v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1139/f90-237>. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/f90-237>. Acesso em: 30 jun. 2023.

CARVALHO, C.D.S. *et al.* Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals. **Ecotoxicology and**

Environmental Safety, [s.l.], v. 196, p. 110560, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110560>. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/32247955>. Acesso em: 22 jul. 2023.

CARVALHO, C.D.S. *et al.* Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 221, p. 445–452, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27989390/>. Acesso em: 22 jul. 2023

CASILLAS, E.; SMITH, L.S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 481–491, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1977.TB04081.X>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04081.x>. Acesso em: 22 jul. 2023.

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. 108768, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108768>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045620300685?via%3Dihub>. Acesso em: 27 jun. 2023.

CHANG, X. *et al.* Neurotoxicity of metal-containing nanoparticles and implications in glial cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 65-81, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.4037>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jat.4037>. Acessado em: 13 jan. 2025.

CHEN, X. *et al.* Morphology and cytochemical patterns of peripheral blood cells of tiger frog (*Rana rugulosa*). **PeerJ**, [s.l.], v.10, p. e13915, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.13915>. Disponível em: <https://peerj.com/articles/13915/>. Acessado em: 13 jan. 2022.

CHIABRANDO, D.; MERCURIO, S.; TOLOSANO, E. Heme and erythropoiesis: more than a structural role. **Haematologica**, [s.l.], v. 99, n. 6, p. 973–983, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.091991>. Disponível em: <https://haematologica.org/article/view/7061>. Acessado em: 13 jan. 2022.

CIFUENTES, F.; VERGARA, J.; HIDALGO, C. Sodium / calcium exchange in amphibian skeletal muscle fibers and isolated transverse tubules Sodium / calcium exchange in amphibian skeletal muscle fibers and isolated transverse tubules. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, [s.l.], v. 279, p. 89–97, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.1.C89>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.2000.279.1.C89>. Acessado em: 13 jan. 2022.

COLIN, N. *et al.* Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 540, p. 307–323. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.099>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896971530293X?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jul. 2023.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, [s.l.], v. 26, p. 249–261, 2004. DOI: <https://doi.org/>

10.1385/MB:26:3:249. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1385/MB:26:3:249>. Acessado em: 13 jan. 2022.

CORTÉZ-GÓMEZ, A. M. M. *et al.* Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: a review. **Universitas Scientiarum**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 229-245, 2015. DOI: 10.11144/Javeriana.SC20-2.efna. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/499/49935358006.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2024.

COSTA, M. J. *et al.* Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 17, p. 153-163, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0178-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-007-0178-5>. Acesso em: 21 ago. 2024.

COSTA, M. J. *et al.* Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p. 184-190, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.022>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651318300319>. Acesso em: 24 out. 2024.

COSTA, M. J. *et al.* Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 75, p. 163-168, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08314>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/XkFwVgPGCxgPCZvhBKM5F3R/?lang=en>. Acesso em: 21 ago. 2024.

COSTA, M. J. *et al.* Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 17, p. 153-163, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0178-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-007-0178-5>. Acesso em: 21 ago. 2024.

COSTA, R. L. *et al.* Toxic, genotoxic, mutagenic, and bioaccumulative effects of metal mixture from settleable particulate matter on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 340, p. 122846, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122846>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0269749123018481?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2024.

CUNHA BASTOS, V.L.F. *et al.* Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**, [s.l.], v. 89, n. 11, p. 1332-1342, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0300908407000983?via%3Dihub>. Acessado em: 11 dez. 2023.

CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): uma revisão. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 34-36, jul. / dez. 2009. Disponível em: <http://periodicos.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/538/278>. Acessado em: 11 dez. 2023.

DAL-MEDICO, S. E. *et al.* Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology**

and Environmental Safety, v. 104, p. 168–174, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.003>. Acessado em: 11 dez. 2023.

DE ANGELIS, C. F. *et al.* Settleable atmospheric particulate matter affects cardiorespiratory responses to hypoxia in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 257, p. 109353, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109353>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045622000886>. Acessado em: 10 ago. 2023.

DE ANGELIS, C. F. *et al.* Settleable atmospheric particulate matter affects the swimming performance and aerobic metabolic rate of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 271, p. 109696, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109696>. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1532045623001515>. Acesso em 01 de nov. 2024.

DE OLIVEIRA, M. C.; DE SOUZA, V. H. E. Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental. **Revista Uningá**, Maringá, v. 10, n. 1, 2006. DOI: <https://doi.org/10.46311/2318-0579.10.eUJ532>. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uninga/article/view/532>. Acessado em: 16 ago. 2023.

DEBECKER, S.; KHUONG, V.D.; STOKS, R. Strong delayed interactive effects of metal exposure and warming: latitude-dependent synergisms persist across metamorphosis. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 51, n. 4, p. 2409–2417, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04989>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28146353/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

DEMINICE, R. *et al.* Evolução de biomarcadores de estresse oxidativo e relação com a performance competitiva em dois momentos da temporada de treinamento de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 4, p. 277-281, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922009000500009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/5gVJjRShYvspqYRR6FYRB3g/>. Acessado em: 16 dez. 2023.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. The Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, [s.l.], v. 25, p. 5-32, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10565-008-9072-z>. Acesso em: 17 jan. 2022.

DO AMARAL, D.F. *et al.* Titanium dioxide nanoparticles as a risk factor for the health of neotropical tadpoles: a case study of *Dendropsophus minutus* (Anura: hylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 29, n. 33, p. 50515–50529, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19098-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-19098-x>. Acesso em: 17 jan. 2022.

DOMÍNGUEZ, P.M.; ARDAVÍN, C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 234, n. 1, p. 90–104, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x>. Acesso em: 17 jan. 2022.

FABIATO, A.; FABIATO, F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s.l.], v. 307, p.

491–522, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1978.tb41979.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/360947/>. Acesso em 13 de nov. 2024.

FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review, aquaculture. **Aquaculture**, [s.l.], v. 500, p. 237–242, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848618314741?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2022.

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.21381>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mas.21381>. Acesso em 13 de nov. 2024.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, [s.l.], v.26, n.1, p. 125–132, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>. Disponível em: <https://academic.oup.com/mutage/article/26/1/125/1054873?login=false>. Acesso em: 17 jan. 2022.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s.l.], v. 455, n. 1, p. 81–95, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0027510700000658?via%3Dihub>. Acessado em: 10 fev. 2023.

FERNANDES, I. F. *et al.* Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 275, p. 130000. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130000>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521004690?via%3Dihub>. Acesso em: 15 mai. 2023.

FERNANDES, I. F. *et al.* Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, (Shaw, 1802). **Chemosphere**, [s.l.], v. 353, p. 141576, 2024. Disponível em: [https://www.sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0045653524004697](https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0045653524004697). Acesso em: 15 dez. 2024.

FERRO, L. A. **Avaliação da função cardíaca in vitro do cascudo *Hypostomus regani* (IHERING, 1905) e dos efeitos da exposição a concentrações subletais do pesticida Fipronil (REGENT 800WG®)**. Orientadora: Ana Lúcia Kalinin. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/1377?show=full>. Acesso em: 23 set. 2024.

FIORESI, M. *et al.* Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 2, p. 178-185, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20122190>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmr/a/LZpShNx9PMD7HcMn6yqLGps/?lang=en>. Acesso em 23 de jul. 2024.

FORTES, W. M. P. A. *et al.* Metal/metalloid bioconcentration dynamics in fish and the risk to human health due to water contamination with atmospheric particulate matter from a metallurgical industrial area. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 902, p. 166119, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166119>. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0048969723047447?via%3Dihub>.

Acesso em: 23 set. 2024.

FREITAS, A. M.; SOLCI, M. C. Caracterização do MP10 e MP2,5 e distribuição por tamanho de cloreto, nitrato e sulfato em atmosfera urbana e rural de Londrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1750-1754, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700013>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/F6KY9vykFkSVP9wvHR6BWLm/>. Acesso em: 16 mai. 2023.

FROST, D. R. 2024. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.2. Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. DOI: doi.org/10.5531/db.vz.0001. Acesso em: 16 mai. 2023.

GALVÃO, E. S. *et al.* Resonant Synchrotron X-ray Diffraction determines markers for iron-rich atmospheric particulate matter in urban region. **Chemosphere**, [s.l.], v. 212, p. 418-428, 2018. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.chemosphere.2018.08.111>.

Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0045653518315868?via%3Dihub>.

Acesso em: 18 set. 2024.

GALVÃO, E. S. *et al.* The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and sources in an industrialized region of southeastern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s.l.], v. 194, n.2, p. 88, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09710-x>. Disponível:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-021-09710-x>. Acesso em: 23 set. 2024.

GARCIA, T. D. **Análise da função cardíaca de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos à piretrina, associada ou não a nanopartículas**. Orientadora: Monica Jones Costa. 2018. 96 f. (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/9625>. Acesso em 21 out. 2024.

GASTELUM, A.; AQUINO, A.; ALDAMA, L. Effect of cadmium chloride during larval development of American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Acta Universitaria**, [s.l.], v. 29, 2019. DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2019.1902>. Disponível em: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-62662019000100125&script=sci_arttext.

Acesso em: 18 set. 2024.

GHASEMI, H.; ROSTAMPOUR, F.; RANJBAR, A. The role of oxidative stress in metals toxicity/mitochondrial dysfunction as a key player. 2014. **GMJ**. 2014;3(1):2-13.

GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; MUKHERJEE, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, [s.l.], v. 33, n. 10, p. 1097–1110, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2863>. Disponível em:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/journal/10991263>. Acesso em: 15 mai. 2023.

GIROTTI, L. *et al.* Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the dam rupture in Mariana, MG (Brazil). **Water, Air, & Soil Pollution**, [s.l.], v. 231, p. 1-15, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-020-04691-y>. Acesso em: 15 mai. 2023.

GOGOI, K. *et al.* Circulatory heavy metals (cadmium, lead, mercury, and chromium) inversely correlate with plasma GST activity and GSH level in COPD patients and impair NOX4/Nrf2/GCLC/GST signaling pathway in cultured monocytes. **Toxicol In Vitro**, [s.l.], v. 54, p. 269–279, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.10.010>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30359721/>. Acesso em: 15 mai. 2023.

GONÇALVES, Y. C. *et al.* Activation of the cannabinoid type 2 (CB2) receptor improves cardiac contractile performance in fish, *Brycon amazonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 277, p. 109822, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109822>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045623002776?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2024.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3890061>. Acesso em: 15 jul. 2023.

GRIGORYAN, A.B.; KARAPETYAN, A.F. Histomorphologic features of the liver and spleen of frogs that live in water bodies of varying degree of pollution. **Morphology**, [s.l.], 130 (4), 1–41. 2006.

GUERRI, C.; GRISOLIA, S. Changes in glutathione in acute and chronic alcohol intoxication. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, p. 53-61, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(80\)80009-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(80)80009-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0091305780800098>. Acesso em 23 de jul. 2024.

GUEZGOUZ, N. *et al.* Heavy metals assessment in the Medjerda river basin (Northeastern Algeria): A preliminary water analysis and toad skin biopsy. **Proceedings of the Zoological Society**. India, v. 74, p. 104-113, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12595-020-00342-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12595-020-00342-6>. Acesso em: 15 jul. 2023.

GURKAN, M.; CETIN, A.; HAYRETDAG, S. Acute toxic effects of cadmium in larvae of the green toad, *Pseudepidalea variabilis* (Pallas, 1769) (Amphibia: Anura) /Akutni toksicni ucinci kadmija na licinke zelene zabe, *Pseudepidalea variabilis* (Pallas, 1769) (Amphibia: Anura). **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, [s.l.], v. 65, n. 3, p. 301-310, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2522>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25222576/>. Acesso em: 11 mai. 2023.

GUSSO-CHOUERI, P. K. *et al.* Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 104, n. 1-2, p. 229-239, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X16300248>. Acesso em: 10 mai. 2023.

GYORI, B. M. *et al.* OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**, [s.l.], v. 2, p. 457–465, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231714000032>. Acesso em: 30 dez. 2022.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/abstract/S0165-6147\(10\)00214-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0165614710002142%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/abstract/S0165-6147(10)00214-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0165614710002142%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 5 jan. 2022.

HASSINE, J.B.; ESCORIZA, D. Amphibians of Algeria: New data on the occurrence and natural history. **Herpetological Bulletin**, n. 142, 2017.

HAYES, T. B. *et al.* Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. **Environmental health perspectives**, [s.l.], v. 114, n. Suppl 1, p. 40-50, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/ehp.8051>. Acesso em: 31 dez. 2022.

HEGDE, G.; KRISHNAMURTHY, S. V. Analysis of health status of the frog *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) living in rice paddy fields of Western Ghats, using body condition factor and AChE content. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 69-76, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.009>. Disponível em: <https://periodicos.univali.br/index.php/eec/article/view/5203>. Acesso em: 12 jan. 2023.

HERNANDEZ, G. *et al.* In vitro effect of aluminium upon erythrocyte membrane properties. **Clinical hemorheology and microcirculation**, [s.l.], v. 40, n. 3, p. 191-205, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3233/CH-2008-1129>. Disponível em: <https://content.iospress.com/articles/clinical-hemorheology-and-microcirculation/ch1129>. Acesso em: 18 fev. 2023.

HERRMANN, H. *et al.* Aquatic ecotoxicity of lanthanum—A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 124, p. 213-238, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131530110X>. Acesso em: 18 fev. 2023.

HIRT, M. N.; HANSEN, A.; ESCHENHAGEN, T. Cardiac tissue engineering: state of the art. **Circulation Research**, v. 114, n. 2, p. 354-367, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300522>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCRESAHA.114.300522>. Acesso em 1 jan. 2024.

HOOFTMAN, R.N., RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmae* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, [s.l.], 104, p. 147-152, 1982. DOI: 10.1016/0165-7992(82)90136-1. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90136-1). Acesso em 1 jan. 2024.

HUANG, C-H. *et al.* Associations and interactions between heavy metals with white blood cell and eosinophil count. **International Journal of Medical Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 331, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijms.68945>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8795800/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

HUANG, P. *et al.* Effects of lanthanum, cerium, and neodymium on the nuclei and mitochondria of hepatocytes: accumulation and oxidative damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 25-32, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.09.001>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1382668910001420>. Acesso em: 22 fev. 2023.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/yYySBjxJSnVFmMjfTbrGR6L>. Acesso em: 20 out. 2024.

HUERTA GARCÍA, E. *et al.* Internalization of titanium dioxide nanoparticles by glial cells is given at short times and is mainly mediated by actin reorganization dependent endocytosis. **NeuroToxicology**, v. 51, p. 27–37, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26340880/>. Acesso em: 20 out. 2024.

INSTITUTO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (IEMA). Air Quality Reports. Institute of the Environment and Water Resources. 2021. Disponível em: <https://iema.es.gov.br/qualidadedoar/relatorios>. Acesso em: 6 jun. 2022.

ISLAM, M.T. *et al.* Acute effects of chromium on hemato-biochemical parameters and morphology of erythrocytes in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 7, p. 664-670, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750019307309>. Acesso em: 6 jun. 2022.

JAIN, R., SINGH, S. P., SINGH, A., SINGH, S., TRIPATHI, P., CHANDRA, A., SOLOMON, S., 2016. Study on physio-biochemical attributes and metallothionein gene expression affected by chromium (VI) in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). **Journal of Environmental Biology**, v. 37 (3), p. 375. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20163209315>. Acesso em: 6 jun. 2022.

JAYAWARDENA, U. A.; WICKRAMASINGHE, D. D.; UDAGAMA, P. V. Cytogenotoxicity evaluation of a heavy metal mixture, detected in a polluted urban wetland: Micronucleus and comet induction in the Indian green frog (*Euphlyctis hexadactylus*) erythrocytes and the *Allium cepa* bioassay. **Chemosphere**, [s.l.], v. 277, p. 130278, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130278>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521007475>. Acesso em: 7 jun. 2022.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, [s.l.], v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02536169>. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/BF02536169>. Acesso em: 15 jul. 2023.

JIANG, Z.-Y., HUNT, J. V., & WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/000326979290122N>. Acesso em: 15 jul. 2023.

JOHANSEN, K. Cardiovascular dynamics in fishes, amphibians, and reptiles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s.l.], v. 127, n. 1, p. 414-442, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb49417.x>. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1965.tb49417.x>. Acesso em: 23 out. 2023.

JOSENDE, M. E. *et al.* Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 49, p. 83-87, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470160X14004877>. Acesso em: 7 jun. 2022.

KACZOR-KAMIŃSKA, M.; SURĄ, P.; WRÓBEL, M. Multidirectional changes in parameters related to sulfur metabolism in frog tissues exposed to heavy metal-related stress. **Biomolecules**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 574, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10040574>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/4/574>. Acesso em: 17 out. 2024.

KARAPETYAN, A. F.; GRIGORYAN, A. B.; JIVANYAN, K. A. Morphofunctional features of the liver and spleen of the marsh frog (*Rana ridibunda*), inhabiting the river, Razdan. **Biological Journal of Armenia**, [s.l.], v. 1, n. 63, p. 14-17, 2011. Disponível em: <http://csiam.sci.am/en/996ZOAFD>. Acesso em: 11 jun. 2022.

KAWAGOE, M. *et al.* Orally administrated rare earth element cerium induces metallothionein synthesis and increases glutathione in the mouse liver. **Life sciences**, [s.l.], v. 77, n. 8, p. 922-937, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.02.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320505002705>. Acesso em: 12 jun. 2022.

KELEPERTZIS, E. *et al.* Distribution and accumulation of metals in tadpoles inhabiting the metalliferous streams of eastern Chalkidiki, northeast Greece. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, [s.l.], v. 63, p. 409-420, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9775-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-012-9775-2>. Acesso em: 12 jun. 2022.

KIDD, P. M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern Med Rev**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 155-176, 1997. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279550514_Glutathione_Systemic_protectant_against_oxidative_and_free_radical_damage. Acesso em: 17 out. 2024.

KLEIN, R. D. *et al.* Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, [s.l.], v. 68, p. 110-118, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.016>. Disponível em: [https://www.sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0306456516302042](https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0306456516302042). Acesso em 3 dez. 2024.

KLINGELHÖFER, D. *et al.* Environmental and health-related research on application and production of rare earth elements under scrutiny. **Globalization and health**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 86, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12992-022-00879-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12992-022-00879-5>. Acesso em: 12 jun. 2022.

KLUTHE, G. J. **Relative Heart Ventricle Mass and Cardiac Performance in Amphibians**. 2012. 45 f. Tese . Portland State University, Portland, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23619575/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

KOTSANIS, N.; ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J.; KAPATA-ZOUMBOS, K. Changes in selected haematological parameters at early stages of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, subjected to metal toxicants: arsenic, cadmium and mercury. **Journal of Applied Ichthyology**, [s.l.], v. 16, n. 6, p. 276-278, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2000.00163.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0426.2000.00163.x>. Acesso em: 12 jun. 2022.

KOVAČ, V. *et al.* Are metal ions that make up orthodontic alloys cytotoxic, and do they induce oxidative stress in a yeast cell model? **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 21, p. 7993, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21217993>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/7993>. Acesso em: 17 out. 2024.

LAJMANOVICH, R. C. *et al.* Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 587, n. 1-2, p. 67-72, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571805001920>. Acesso em: 12 jun. 2022.

LANCTÔT, C. M.; CRESSWELL, T.; MELVIN, S. D. Uptake and tissue distributions of cadmium, selenium and zinc in striped marsh frog tadpoles exposed during early post-embryonic development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 144, p. 291–299, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.047>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317303822?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jul. 2023.

LAYLAND, J.; YOUNG, I.S.; ALTRINGHAM, J. D. The effect of cycle frequency on the power output of rat papillary muscles in vitro. **Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 198, n. 4, p. 1035-1043, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.198.4.1035>. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article/198/4/1035/6989/The-Effect-of-Cycle-Frequency-on-the-Power-Output>. Acesso em: 21 ago. 2024.

LEDUC, J. *et al.* Copper and nickel effects on survival and growth of northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) tadpoles in field-collected smelting effluent water. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 687-694, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3227>. Disponível em: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.3227>. Acesso em: 12 jun. 2022.

LIAO, C. *et al.* The intricate role of selenium and selenoproteins in erythropoiesis. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 127, p. 165-171, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.578>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089158491830772X>. Acesso em: 22 jul. 2022.

LOUMBOURDIS, N. S.; VOGIATZIS, A. K. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 53, n. 1, p. 52-58, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2153>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651302921536>. Acesso em: 22 jul. 2022.

LUEDTKE, J. A. *et al.* Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. **Nature**, [s.l.], v. 622, n. 7982, p. 308-314, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06578-4>. Acesso em: 1 jan. 2024.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X1000411X>. Acesso em: 1 jan. 2024.

LÜTTGAU, H. C.H; NIEDERGERKE, R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. **The Journal of Physiology**, [s.l.], v. 143, n. 3, p. 486, 1958. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1958.sp006073>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1356728/>. Acesso em 3 de dez. 2024.

MAHAYE, N. *et al.* Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s.l.], v. 773, p. 134-160, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383574216301569>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MANASEE, W.A., WEERATHUNGA, T.W., RAJAPAKSA, G. The impact of elevated temperature and CO₂ on growth, physiological and immune responses of *Polypedates cruciger* (common hourglass tree frog). **Frontiers in Zoology**, [s.l.], v. 17, p. 1-25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0348-3>. Acesso em: 21 ago. 2022.

MARASCHI, A. C. *et al.* The impact of settleable atmospheric particulate on the energy metabolism, biochemical processes, and behavior of a sentinel mangrove crab. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 477, p. 135316, 2024. DOI: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.jhazmat.2024.135316>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0304389424018958?via%3Dihub>. Acesso em: 18 set. 2024.

MEDINA, M. F. *et al.* Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cadmium. **Turkish Journal of Biology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 229-238, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3906/biy-1505-72>. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol40/iss1/21/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MERCOLA, M; GUZZO, R. M.; FOLEY, A. C. Cardiac Development in the Frog. In: **Heart development and regeneration**. Academic Press, 2010. p. 87-102. Acesso em: 19 fev. 2025.

MILANI, D. *et al.* The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry: an International Journal**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 845-854, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620220424>. Disponível em: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620220424>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MINGUILLÓN, M. C. *et al.* Seasonal and spatial variations of sources of fine and quasi-ultrafine particulate matter in neighborhoods near the Los Angeles-long beach harbor. **Atmospheric Environment**, [s.l.], v. 42, n. 32, p. 7317-7328, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.07.036>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1352231008006882?via%3Dihub>.

Acesso em: 30 dez. 2023.

MIYAKAWA, M.; ARAI, Y.; KIKUYAMA, S. Dopamine and Background Adaptation in Bullfrog Tadpoles (*Rana catesbeiana*): A Pharmacological and Histofluorescence Study. **Endocrinologia Japonica**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 105-111, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.29.105>. Disponível em:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj1954/29/1/29_1_105/_article/-char/ja/. Acesso em 3 de dez. 2024.

MONFERRÁN, M. V. *et al.* From water to edible fish. Transfer of metals and metalloids in the San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). Implications associated with fish consumption. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 63, p. 48-60, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.048>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470160X15006809>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MONTEIRO, D. A. *et al.* Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 143, n. 2, p. 141-149, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.01.004>. Disponível em:

<https://www-sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S153204560600024X?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out. 2024.

MONTEIRO, R. **Efeito do material particulado atmosférico sedimentável oriundo de área industrial siderúrgica em órgãos do robalo-peva (*Centropomus parallelus*): Bioconcentração, estresse oxidativo e histopatologias**. Orientadora: Marisa Narciso Fernandes. 2023. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023a. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/17817?show=full&locale-attribute=en>. Acesso em: 23 set. 2024.

MONTEIRO, R. *et al.* Metalliferous atmospheric settleable particulate matter action on the fat snook fish (*Centropomus parallelus*): metal bioaccumulation, antioxidant responses and histological changes in gills, hepatopancreas and kidneys. **Chemosphere**, [s.l.], v. 330, p. 138715, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138715>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653523009827>. Acesso em: 30 dez. 2023b.

MORADO, C. N., ARAÚJO, F. G., GOMES, I. D. The use of biomarkers for assessing effects of pollutant stress on fish species from a tropical river in Southeastern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 39, n. 4, p. 431-439, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v39i4.34293>. Disponível em:

<https://www.redalyc.org/journal/1871/187153564004/html/>. Acesso em: 30 dez. 2023.

MOTTA, A.G.C. *et al.* Genotoxic and mutagenic effects of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae). **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, [s.l.], v. 14, p. 100356, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100356>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221515322030338X>. Acesso em: 30 out. 2023.

NNAJI, N. D. *et al.* Bioaccumulation for heavy metal removal: a review. **SN Applied Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. 125, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-023-05351-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-023-05351-6>. Acesso em: 26 ago. 2024.

OJHA, S., ROY, A., MOHAPATRA, A. K. Environmentally relevant concentrations of Cadmium impair morpho-physiological development and metamorphosis in *Polypedates maculatus* (Anura, Rhacophoridae) tadpoles. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, [s.l.], v. 3, p. 133-141, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2021.03.002>. Acesso em: 30 out. 2023.

OLIVATTO, T. F.; COSTA, R. L.; BOURSCHEIDT, V. Sensoriamento remoto de material particulado e aerossóis: análise cienciométrica. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 24, n. 96, p. 140–154, 2023. DOI: <http://doi.org/10.14393/RCG249668624>. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/caminhosdegeografia/article/view/68624>. Acesso em: 7 dez. 2023.

OLIVE, P. L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 487-495, 1988. DOI: 10.1002/em.2850110409. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/em.2850110409>. Acesso em: 21 ago. 2024.

OLIVE, P. L., BANÁTH, J. P., DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, [s.l.], v. 122, n. 1, p. 86-94, 1990. DOI: <https://doi.org/10.2307/3577587>. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3577587?origin=crossref>. Acesso em: 13 mar. 2023.

OLIVEIRA, L.L.D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. Orientadora: Odete Rocha. 2014. 257 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OLIVERA, J. F.; PIZARRO, G. A study of the mechanisms of excitation–contraction coupling in frog skeletal muscle based on measurements of [Ca²⁺] transients inside the sarcoplasmic reticulum. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, [s.l.], v. 39, p. 41-60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10974-018-9497-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10974-018-9497-9>. Acesso em: 23 out. 2024.

ORCHARD, C., BRETTE, F. T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 77, n. 2, 237–244, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm002>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X84711835>. Acesso em: 21 ago. 2024.

PARK, C. J. *et al.* Developmental and acute toxicity of cetylpyridinium chloride in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 177, p. 446-453, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X16301850>. Acesso em: 13 mar. 2023.

PATAR, A. *et al.* Cadmium pollution and amphibians – studies in tadpoles of *Rana limnocharis*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 144, p. 1043–1049, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.088>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653515301764>. Acesso em: 30 dez. 2023.

PELUSO, J. *et al.* Metals, pesticides, and emerging contaminants on water bodies from agricultural areas and the effects on a native amphibian. **Environmental Research**, [s.l.], v. 226, p. 115692, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115692>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001393512300484X>. Acesso em: 30 mar. 2023.

PENG, F. *et al.* Hematology and serum biochemistry parameters of captive Chinese alligators (*Alligator sinensis*) during the active and hibernating periods. **Tissue and Cell**, [s.l.], v. 51, p. 8-13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.02.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040816617304366>. Acesso em: 30 mar. 2023.

PFAFFENSELLER, B. *et al.* Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. **Expert review of neurotherapeutics**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 827-842, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1586/14737175.2013.811981>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737175.2013.811981>. Acesso em: 30 dez. 2023.

PINTO, W. J.; GUIDA-CARDOSO, S. M.; AREAS, M. A. Fisiologia dos adrenoceptores cardíacos. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 77-96, 2005. Disponível em: <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/1196>. Acesso em 3 de dez. 2024.

POLLO, F. E. *et al.* Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s.l.], v. 187, p. 1-9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-015-4802-1>. Acesso em: 13 mar. 2023.

QVARFORTH, A. *et al.* Future food contaminants: An assessment of the plant uptake of Technology-critical elements versus traditional metal contaminants. **Environment International**, [s.l.], v. 169, p. 107504, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107504>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412022004317>. Acesso em: 13 mar. 2023.

RANJITHA, T.; SHARATH CHANDRA, S. P. Biological and ecological impact of iron and iron nanoparticles across diverse array of fish models: a review. **Ecology, Environment and Conservation**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 180-184, 2020. Disponível em: https://www.envirobiotechjournals.com/issues/issue_articles.php?iid=298&jid=3. Acesso em 3 de dez. 2024.

RECHENMACHER, C. *et al.* A multibiomarker approach in rats to assess the impact of pollution on Sinos River, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 70, n. 4, p. 1223-1230, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000600012>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/9jRGBMb9n49tqCWvxmW8vhk/?lang=en>. Acesso em: 6 dez. 2023.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. [38] Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *In: Methods in enzymology*. Academic press, 1994. p. 357-363. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/abs/pii/S0076687994330417?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2024.

RIBEIRO, D. R. G. *et al.* Metal and metalloid distribution in different environmental compartments of the middle Xingu River in the Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 605, p. 66-74, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.143>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717315474>. Acesso em: 22 out. 2024.

RIBEIRO, D. R.G. **Concentração de metais em distintos compartimentos ambientais e biomarcadores bioquímicos em peixes residentes para avaliação da qualidade ambiental de região do médio rio Xingu, Amazônia, Brasil**. Orientadora: Lílian Lund Amado. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2020. Disponível em: https://ppgeap.propesp.ufpa.br/ARQUIVOS/dissertacoes/2015/PPGEAP_Disserta%C3%A7%C3%A3o_Danielle%20Regina%20Gomes%20Ribeiro_2015.pdf. Acesso em: 22 out. 2024.

RISSOLI, R. Z. **Comparação entre os efeitos da exposição em nível subletal de glifosato e dos herbicidas a base de glifosato Roundup Original® e Roundup Transorb R® sobre girinos de rã-touro**. Orientadora: Ana Lúcia Kalinin. 2012. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

ROBINSON, S. A. *et al.* Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 284, p. 117149, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117149>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749121007314>. Acesso em: 13 mar. 2023.

ROBLES, L. T., RIBEIRO, A. R. C., CUTRIM, S. S. Gestão da produtividade da manutenção em portos com aplicação de técnicas de medição. **Sistemas & Gestão**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 633–643, 2016. DOI: <https://doi.org/10.20985/1980-5160.2015.v10n4.639>. Disponível em: <https://www.revistasg.uff.br/sg/article/view/639>. Acesso em: 21 ago. 2024.

SADIQ, I. Z. *et al.* Cytoprotective, conjugative and antioxidant activities of glutathione; and its role in removal of toxic metabolites and protein protection: a review. **Chem Res. J**, [s.l.], v. 1, p. 147-153, 2016. Disponível em: <https://chemrj.org/download/vol-1-iss-4-2016/chemrj-2016-01-04-147-153.pdf>. Acesso em: 17 out. 2024.

SALLA, R. F. *et al.* Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, [s.l.], v. 323, n. 7, p. 487-496, 2015. DOI: 10.1002/jez.1945. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26055358/>. Acesso em: 21 ago. 2024.

SALLA, R.F. **Função cardíaca e metabolismo de machos e fêmeas de *Rhinella icterica* no período reprodutivo**. Orientadora: Ana Lúcia Kalinin. 2017. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

SANTOS, J.M., *et al.* Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 24, p.22026–22039, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9677-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9677-y>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SANTOS, J.M., REIS, N.C., GALVÃO, E.S., SILVEIRA, A., GOULART, E.V., LIMA, A.T. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 24, p.22026–22039, 2017.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9677-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9677-y>. Acesso em: 29 ago.2024.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal – Adaptação y médio ambiente**. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1976. 512 p.

SCHOFIELD, Keith. The metal neurotoxins: an important role in current human neural epidemics?. **International journal of environmental research and public health**, [s.l.], v. 14, n. 12, p. 1511, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph14121511>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/14/12/1511>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SCHUIJT, L. M. *et al.* (Eco) toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: facts, challenges, and future. **Science of the total environment**, [s.l.], v. 795, p. 148776, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721038481>. Acesso em: 10 mar.2023.

SEIXAS FILHO, J.T.; PEREIRA, M.M.; MELLO S.C.R.P. **Manual de ricultura para o produtor**. Rio de Janeiro: Editora HP Comunicação, 2017. 155 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341194300_Manual_de_Ricultura_Para_o_Produtor. Acesso em 29 ago. 2024.

SHAHJAHAN, M. *et al.* Nuclear and cellular abnormalities of erythrocytes in response to thermal stress in common carp *Cyprinus carpio*. **Frontiers in Physiology**, [s.l.], v. 11, p. 543, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00543>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2020.00543/full>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent projection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90045-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0163725890900454?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out.2024.

SHARMA, S. K.; GOLOUBINOFF, P.; CHRISTEN, P. Non-native proteins as newly-identified targets of heavy metals and metalloids. **Cellular Effects of Heavy Metals**, [s.l.], p. 263-274, 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-0428-2_12. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0428-2_12. Acesso em 3 de dez. 2024.

SHAW, P. *et al.* Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 703, p. 135622, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135622>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969719356177>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SHEMAROVA, I. V. *et al.* Peculiarities of Ca²⁺-regulation of functional activity of myocardium of frog *Rana temporaria*. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, [s.l.], 44 (1), 44–57, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0022093008010064>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0022093008010064>. Acesso em: 30 set. 2024

SHEN, J. *et al.* The role of iron overload and ferroptosis in arrhythmia pathogenesis. **IJC Heart & Vasculature**, [s.l.], v. 52, p. 101414, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2024.101414>.

Disponível em: [https://www.sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2352906724000800](https://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2352906724000800). Acesso em: 23 out. 2024

SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. J. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. **Physiology**, [s.l.], v. 29, n. 6, p. 456-469, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1152/fisiol.00015.2014>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00015.2014>. Acesso em: 17 out. 2024.

SHIELS, H. A.; WHITE, E. The Frank–Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. **Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 211, n. 13, p. 2005-2013, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.003145>. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article/211/13/2005/17557/The-Frank-Starling-mechanism-in-vertebrate-cardiac>. Acesso em: 17 out. 2024.

SHIZUKUDA, Y.; ROSING, D. R. Iron overload and arrhythmias: Influence of confounding factors. **Journal of Arrhythmia**, [s.l.], v. 35, n. 4, p. 575-583, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/joa3.12208>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/joa3.12208>. Acesso em: 17 out. 2024.

SHUBA, Y. M. *et al.* A novel molecular determinant for cAMP-dependent regulation of the frog heart Na⁺-Ca²⁺ exchanger. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18819-18825, 1998. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)80206-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)80206-X/fulltext). Acesso em 3 de dez. 2024.

SIEVERS, M. *et al.* Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. **Ecotoxicology and environmental safety**, [s.l.], v. 161, p. 482-488, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.028>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651318305189>. Acesso em: 19 jun. 2022.

SILVA, A. S.; ZANESCO, A. Exercício físico, receptores β-adrenérgicos e resposta vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, [s.l.], v. 9, p. 47-56, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-54492010000200007>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvb/a/sFXqgSGskpZgxLvnk9pwVMk/?lang=pt>. Acesso em 3 de dez. 2024.

SILVA, C.V.R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO, M. *et al.* (org.). **Ecologia de Reservatórios e Interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências-Universidade de São Paulo, 2015. cap. 22, p.340-353.

SILVA, F. L. *et al.* Swimming ability in tadpoles of *Physalaemus cf. cuvieri*, *Scinax x-signatus* and *Leptodactylus latrans* (Amphibia: Anura) exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 13-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5132/eec.2021.01.02>. Disponível em: <https://eec.ecotoxbrasil.org.br/index.php/eec/article/view/333>. Acesso em: 19 jun. 2022.

SILVA, F. P. T. B. *et al.* Mutagenic effect of fresh water (well, rivers Fica and Minas Gerais, close to the town of Ubitatã, Paraná, Brazil) in the animal test system. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 101-105, 2004. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/1665/1007>. Acessado em: 11 dez. 2023.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [s.l.], v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014482788902650>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SINGH, P.; DEY, M.; RAMANUJAM, S. N. A study on bioaccumulation of heavy metals in two anuran tadpoles: *Clinotarsus alticola* and *Leptobranchium smithi* from Rosekandy tea estate, Cachar, Assam. **Current World Environment**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 325, 2016. DOI: <https://doi.org/10.12944/CWE.11.1.39>. Disponível em: https://www.cwejournal.org/pdf/vol11no1/Vol11_No1_p_325-332.pdf. Acesso em: 14 jun. 2022.

SLOBODIAN, M. R. *et al.* The effects of essential and non-essential metal toxicity in the *Drosophila melanogaster* insect model: A review. **Toxics**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 269, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics9100269>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2305-6304/9/10/269>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SMITH, G. L.; ALLEN, D. G. Effects of metabolic blockade on intracellular calcium concentration in isolated ferret ventricular muscle. **Circulation research**, [s.l.], v. 62, n. 6, p. 1223-1236, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.RES.62.6.1223>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.62.6.1223>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SOARES, M. P. *et al.* Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 257, p.109330. 2022. DOI: [10.1016/j.cbpc.2022.109330](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330>. Acesso em: 30 jul. 2023.

SOUSA, D. O. T.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Uma revisão sobre os efeitos do material particulado atmosférico (MPA) aos organismos aquáticos. **Unisanta BioScience**, [s.l.], v. 3, p. 124-129, 2022. Disponível em: <https://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/view/3183/2179>. Acesso em: 10 jun. 2023.

SOUZA, F. A. **Respostas bioquímicas e morfológicas de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao material particulado atmosférico sedimentável oriundo de indústrias siderúrgicas**. Orientadora: Marisa Narciso Fernandes. 2021. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/15861>. Acesso em: 23 set. 2024.

SOUZA, I. C. *et al.* Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 658, p. 798-808, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.142>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.142>. Acesso em: 20 dez. 2022.

SOUZA, I. C. *et al.* Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: integrating chemical and biological data by chemometrics. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 335–348, 2014a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1191-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-014-1191-0>. Acesso em 29 ago. 2024.

SOUZA, I. C. *et al.* Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 753, p. 141976, 2021a. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144651. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144651>. Acesso em: 30 jul. 2023.

SOUZA, I. C. *et al.* Changes in bioaccumulation and translocation patterns between root and leaf of *Avicennia schaueriana* as adaptive response to different levels of metals in mangrove system. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 94, n. 1–2, p. 176–184, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.02.032>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X15001228>. Acesso em: 30 jul. 2023.

SOUZA, I. C. *et al.* Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 640–641, p. 501–511, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.302. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.302>. Acesso em: 31 dez. 2023.

SOUZA, I. C. *et al.* Metallic nanoparticle contamination from environmental atmospheric particulate matter in the last slab of the trophic chain: Nanocrystallography, subcellular localization and toxicity effects. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 814, p. 152685, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152685>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969721077639?via%3Dihub>. Acesso em: 31 dez. 2023.

SOUZA, I. C. *et al.* Trophic transfer of emerging metallic contaminants in a neotropical mangrove ecosystem food web. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 408, p. 124424, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124424>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124424>. Acesso em: 10 jul. 2022.

SOUZA, I.C. *et al.* Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 180, p. 136-144, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749113002649>. Acesso em: 29 ago. 2024.

SOUZA, I.C. *et al.* Matching pollution with adaptive changes in mangrove plants by multivariate statistics. A case study, *Rhizophora mangle* from four neotropical mangroves in Brazil. **Chemosphere**, [s.l.], v. 108, p. 115–124, 2014b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.066>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004565351400335X?via%3Dihub>. Acesso em: 29 ago. 2024.

STARLING, M. C. V. M. *et al.* Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of hazardous materials**, [s.l.], v. 372, p. 17-36, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389418302759>. Acesso em: 29 ago. 2022.

STORER, T.I. *et al.* **Zoologia Geral**. Tradução: Erika Schlenz. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2003. 816 p.

SULLIVAN, S. M. P.; RODEWALD, A. D. In a state of flux: the energetic pathways that move contaminants from aquatic to terrestrial environments. **Environmental Toxicology & Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 6, 2012. Disponível em:

<https://senr.osu.edu/sites/senr/files/imce/files/CVs/xtraPDFandOtherFiles/Sullivan/Sullivan%20et%20al%202012a.pdf>. Acesso em: 11 abri. 2023.

SUTTON, S. G.; BULT, T. P.; HAEDRICH, R. L. Relationships among fat weight, body weight, water weight, and condition factors in wild Atlantic salmon parr. **Transactions of the American Fisheries Society**, [s.l.], v. 129, n. 2, p. 527-538, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2000\)1292.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2000)1292.0.CO;2). Disponível em: [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8659\(2000\)129%3C0527:RAFWBW%3E2.0.CO;2](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8659(2000)129%3C0527:RAFWBW%3E2.0.CO;2). Acesso em: 29 ago. 2022.

SZELIGOWSKI, R. V. *et al.* Road salt compromises functional morphology of larval gills in populations of an amphibian. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 292, p. 118441, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118441>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118441>. Acesso em: 11 abri. 2023.

TABREZ, S. *et al.* Genotoxicity testing and biomarker studies on surface waters: an overview of the techniques and their efficacies. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 250-275, 2011. DOI 10.1080/10590501.2011.601849. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10590501.2011.601849>. Acesso em: 13 abri. 2023.

THAMMACHOTI, P. *et al.* Morphometric and gravimetric parameters of the rice frog *Fejervarya limnocharis* living in areas with different agricultural activity. **Journal of Environmental Protection**, [s.l.], v. 3, n. 10, p. 1403-1408, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4236/jep.2012.310159>. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=23906>. Acesso em: 21 ago. 2022.

THRALL, M.A. Hematology of amphibians. *In*: THRALL, M.A., BAKER, D.C., LASSEN, E.D. (Eds.), **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004, p. 313–320.

TIBBITS, G. F.; MOYES, CHRZSTOPHER D.; HOVE-MADSEN, Leif. Excitation–contraction coupling in the teleost heart. **Fish Physiology**, [s.l.], v. 12, n. Part A, p. 267-304, 1992.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206:AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206:AID-EM8>3.0.CO;2-J). Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J). Acesso em: 21 ago. 2022.

TIJSKENS, P.; MEISSNER, G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Location of ryanodine and dihydropyridine receptors in frog myocardium. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 84, n. 2, p. 1079-1092, 2003. Disponível em: [https://www.cell.com/AJHG/fulltext/S0006-3495\(03\)74924-8](https://www.cell.com/AJHG/fulltext/S0006-3495(03)74924-8). Acesso em 3 de dez. 2024.

U.S EPA. **Particulate Matter (PM) Basics**. 20 jun. 2024. Disponível em: <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM>. Acesso em: 28 ago. 2024.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Manual for bench and pilot-scale treatment studies. Office of ground water and drinking water, Cincinnati,

OH 1 (1–3), 108, 1996. Disponível em: <https://www.epa.gov/laws-regulations>. Acesso em: 21 ago. 2022.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Manual for bench and pilot-scale treatment studies. Office of ground water and drinking water, Cincinnati, OH 1 (1–3), 108, 1996. Disponível em: <https://www.epa.gov/laws-regulations>. Acesso em: 21 ago. 2022.

UNRINE, J. M. *et al.* Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 149, n. 2, p. 182-192, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.039>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749107000978>. Acesso em: 21 ago. 2022.

VALENTE, D. *et al.* Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 42, 2017. DOI: 10.1590/2317-6369000124415. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124415>. Acesso em: 10 fev. 2023.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2005/00000012/00000010/art00003>. Acesso em 21 out. 2024.

VAN DE WOUW, M. *et al.* Monocyte mobilisation, microbiota and mental illness. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s.l.], v. 81, p. 74-91, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889159119306075>. Acesso em: 20 set. 2022.

VELMA, V.; VUTUKURU, S. S.; TCHOUNWOU, P. B. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. **Reviews on environmental health**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 129-146, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh.2009.24.2.129>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/REVEH.2009.24.2.129/html>. Acesso em: 20 set. 2022.

VERONEZ, A. C. *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.], 174, 101–108, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.011>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X16300388>. Acesso em: 21 ago. 2022.

VERONEZ, A.C.S. **Avaliação da Exposição de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) ao ferro, manganês e minério de ferro**. Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Programa de Pós Graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, Espírito Santo, 2013.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algae: from aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. **Química nova**, Campinas, v. 27, p. 139-145, 2004. DOI: 10.1590/S0100-40422004000100024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100024>. Acesso em: 30 jul. 2023.

VIJITKUL, P. *et al.* Investigation of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after fluoxetine exposure. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 9, p. 588-596, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.031>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750022000610>. Acesso em: 23 set. 2022.

VINCENT, J-L. Understanding cardiac output. **Critical care**, [s.l.], v. 12, p. 1-3, 2008. DOI: 10.1186/cc6975. Epub 2008 Aug 22. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18771592/>. Acesso em: 23 set. 2022.

WAKE, D. B.; KOO, M. S. Amphibians. **Current Biology**, [s.l.], v. 28, n. 21, p. R1237- R1241, 2018. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(18\)31223-5.pdf](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(18)31223-5.pdf). Acesso em: 12 jul. 2023.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. 4. Ed. Nova York: CRC press, 2012. 383 p. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b11767/principles-ecotoxicology-peakall-sibly-walker-sibly>. Acesso em 28 ago. 2024.

WANG, Y-W.; YANG, G-C. Modulation and control of DNA charge inversion. **Chinese Physics B**, [s.l.], v. 26, n. 12, p. 128706, 2017. DOI: 10.1088/1674-1056/26/12/128706. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1674-1056/26/12/128706/meta>. Acesso em 28 ago. 2024.

WERDER, E. J. *et al.* Selenium modifies associations between multiple metals and neurologic symptoms in Gulf states residents. **Environmental Epidemiology**, [s.l.], v. 4, n. 6, p. e115, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1097/EE9.0000000000000115>. Disponível em: https://journals.lww.com/environepidem/abstract/2020/12000/selenium_modifies_association_s_between_multiple.8.aspx. Acesso em: 21 ago. 2022.

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**, [s.l.], v. 244, n. 1-4, p. 349-357, 2005. DOI: <https://doi/10.1016/j.aquaculture.2004.11.024>. Disponível em: <https://linkinghub-elsevier.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/retrieve/pii/S0044848604006891>. Acesso em: 10 ago. 2024.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses a comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 12, p. 1735-1742, 1996. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/9222438>. Acesso em: 10 ago. 2024.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental Physiology of Animals**. 2nd. 2005.

WILSON, R. W. Aluminum. Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals, 67–123, 2011. In WOOD, C. M.; FARRELL, A. P; BRAUNER, C. J. (Ed.). **Homeostasis and toxicology of essential metals**. Academic press, 2012.

WINTER, M. J.; ELLIS, L. C.; HUTCHINSON, T. H. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 629, n. 2, p. 89–99, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.01.010>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138357180700068X?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2022.

WITESKA, M. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. **Electronic journal of ichthyology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 35-41, 2005. Disponível em: https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/543672. Acesso em: 21 jul. 2022.

WOLF, A. A. *et al.* The ontogeny of monocyte subsets. **Frontiers in immunology**, [s.l.], v. 10, p. 1642, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01642>, 10, 1642. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.01642/full>. Acesso em: 21 jul. 2022.

WOOD, C. M. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. *In*: WOOD, C.M., FARRELL, A.P., BRAUNER, C.J. (Ed.), **Homeostasis and 813 Toxicology of Essential Metals**. Academic Press, Amsterdam, 2011. p. 1–51. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31001-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31001-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1546509811310230>. Acesso em: 21 jul. 2022.

XU, Y. *et al.* Physicochemical properties, structural characterization and protective effect on erythrocyte oxidative damage of selenized *Lonicera caerulea* L. polysaccharide. **Food Science**. [s.l.], v. 44, n. 6, p. 17–24, 2023. DOI: <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20220710-098>. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20230191428>. Acesso em: 21 jul. 2023.

YIN, X. *et al.* Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian *Chinese toad* (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 680, n. 1-2, p. 2-6, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571809001934>. Acesso em: 21 jul. 2023.

YOLOGLU, E.; OZMEN, M. 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, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X15300461>. Acesso em: 21 jul. 2023

ZARIPOVA, F. F.; FAIZULIN, A. I.; YUMAGULOVA, G. R. The content of heavy metals in the liver of the marsh frog *Rana ridibunda*. **Pallas**, Bashkir Zauralye. Bull. Orenbg. State Univ. p. 145-146, 1771.

ZHELEV, Z. M.; POPGEORGIEV, G.; MEHTEROV, N. H. Changes in the hepatosomatic index and condition factor in the populations of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from anthropogenically polluted biotopes in Southern Bulgaria. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Bulgaria, v. 21, n. 3, p. 517–522, 2015. Disponível em: <https://www.agrojournal.org/21/03-08.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2023.

ZHELEV, Z.M.; POPGEORGIEV, G.S.; ANGELOV, M.V. Investigating the changes in the morphological content of the blood of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a result of anthropogenic pollution and its use as an environmental bioindicator. **Acta Zoologica Bulgarica**, Bulgaria, v. 65, p. 187–196. 2013.