

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

ISABELA FERREIRA FERNANDES

Efeitos da exposição de girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) ao material particulado atmosférico sedimentável.

Sorocaba 2025

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

ISABELA FERREIRA FERNANDES

Efeitos da exposição de girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) ao material particulado atmosférico sedimentável.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Cleoni dos Santos Carvalho

Sorocaba 2025

Ao meu avô Antônio.

AGRADECIMENTO

Á Deus pelo dom da vida, sem Ele nada jamais faria sentido nessa jornada e não teria chego até aqui, e a Nossa Senhora Aparecida que me guarda e guia em todos os momentos.

Á minha família, em especial meus pais Lúcia e Fabio que sempre foram meus maiores incentivadores e apoiadores, sem vocês nada na minha vida faria sentido e se tratando dessa jornada, nada sairia como o planejado, meu amor e gratidão por vocês será pra sempre incondicional. Obrigada por não desistirem, quando eu mesma pensei em desistir!

Á minha orientadora Prof^a Dr^a Cleoni dos Santos Carvalho, por toda nossa caminhada, a possibilidade desse novo trabalho e amizade construída durante toda essa jornada. Você é um grande exemplo na área acadêmica e na ciência, obrigada por ser essa inspiração.

Á Heidi, pela amizade, pelos podcasts que escutamos juntas enquanto fazíamos tantas coisas e todo o suporte nas análises e na rotina do laboratório.

Aos meus amigos de laboratório, Guilherme, Victor, Gabriel obrigada pelo suporte, por toda ajuda, pelas trocas de experiências, conversas e risadas, não fazemos nada sozinhos nessa vida.

Ás minhas amigas de longa data, Verônica, Luana, Ana Elisa e Ana Beatriz obrigada por sempre me ouvirem, opinarem, palpitarem mesmo que sem entender nada, ao nosso mascotinho, Benício, por ser nosso pacotinho de amor e alegria. A amizade de vocês é valiosa.

Às minhas amigas Carolina e Jananína, obrigada por torcerem, rezarem e sempre que possível estar presente. Valeu cada encontro, cada pergunta, preocupação e zelo comigo e com o meu trabalho. Amo nossa amizade.

Aos demais amigos que de alguma forma se fizeram presente nesse momento, me apoiando, torcendo e de alguma forma contribuíram para que tudo desse certo durante todo esse período.

De forma muito carinhosa e especial, também deixo meu agradecimento ao Hospital Gpaci e todo quadro de funcionários, se hoje cheguei aqui devo muito aos cuidados de todos.

Aos professores que ao longo dessa jornada auxiliaram para que tudo isso fosse possível.

Á Universidade Federal de São Carlos – UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental por toda estrutura e possibilidade da minha formação.

Á Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo.

Á FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por aprovar o projeto em que meu trabalho faz parte (FAPESP 2019/08491-0).

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

RESUMO

A poluição atmosférica é uma grande preocupação atual, pois além de afetar a saúde humana, pode também trazer efeitos negativos à fauna e flora. Este tipo de poluição é originado da queima de combustível e às produções industriais, por exemplo, podendo dar origem ao chamado material particulado atmosférico (MPA), popularmente conhecido como “pó preto”. Tendo em vista as possibilidades da formação desse MPA, torna-se necessária a avaliação do conteúdo desse material, bem como os efeitos que podem causar nos organismos aquáticos. Girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, foram expostos ao material particulado atmosférico sedimentável, MPA-Se (1g L⁻¹, 96h) para análise de metal/metalóide e de biomarcadores bioquímicos (de estresse oxidativo, de neurotoxicidade e de metabolismo). Após 96h de exposição, a água do MPA-Se continha 18 dos 28 metais/metalóides detectados no MPA. Ferro (Fe⁵⁶) e alumínio (Al) foram os que apresentaram maiores concentrações, cromo (Cr), manganês (Mn), chumbo (Pb) e cobre (Cu) aumentaram de 10 a 20 vezes, titânio (Ti), vanádio (V), estrôncio (Sr), rubídio (Rb), cádmio (Cd), estanho (Sn) e níquel (Ni) aumentaram de 1 a 3 vezes em relação ao controle. A bioacumulação de metais/metalóides na água de exposição variou significativamente entre os órgãos, com o músculo e o fígado apresentando as maiores concentrações de metais, seguidos pelo cérebro. A lipoperoxidação (LPO) e o malondialdeído (MDA) aumentaram apenas no músculo, enquanto as proteínas carboniladas (PC) aumentaram no fígado e no cérebro. Em relação à enzima óxido nítrico sintase (NOS), houve aumento no fígado e no cérebro no grupo exposto ao MPA-Se. A atividade da catalase (CAT) diminuiu no fígado e nos músculos, enquanto a atividade da glutathione peroxidase (GPx) aumentou no fígado e nos rins e diminuiu no músculo. A glutathione S-transferase (GST), responsável pela desintoxicação, aumentou no fígado e diminuiu nos músculos e nos rins. A atividade da colinesterase (ChE) aumentou apenas no músculo. Os resultados indicam estresse oxidativo, devido à oxidação catalisada por metais, presentes do MPA-Se. No que se refere ao metabolismo houve aumento das enzimas piruvato quinase e fosfofrutoquinase (PK e PFK) no fígado, já no músculo houve um aumento na hexoquinase (HK) e uma diminuição na malato desidrogenase (MDH), enquanto para o cérebro houve um aumento, o metabólito triglicérido diminuiu no fígado e cérebro, aumentou no músculo. Já as aminotransferases: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) aumentaram no músculo, enquanto a fosfatase alcalina, (ALP), a lactato desidrogenase (LDH) e a glicose apresentaram alterações apenas no cérebro e a proteína não teve diferença significativa. Com esses resultados é possível verificar um quadro de estresse oxidativo pela presença dos metais, componentes do MPA. Assim, os resultados permitem demonstrar os efeitos deletérios do MPA-Se no ambiente aquático, afetando negativamente os girinos de rã-touro, por causar estresse oxidativo induzido pelos metais nele incorporados. Esse efeito pode ser evidenciado pelas respostas dos biomarcadores bioquímicos investigados nos diferentes órgãos.

Palavras chave: pó-preto, anuros, marcadores de estresse, metabolismo, ecotoxicidade.

ABSTRACT

Air pollution is a major concern today, as it not only affects human health but can also have negative effects on fauna and flora. This type of pollution originates from fuel combustion and industrial production, for example, and can give rise to the so-called atmospheric particulate matter (MPA), popularly known as “black dust”. Given the possibilities of this MPA formation, it is necessary to evaluate the content of this material, as well as the effects it can cause on aquatic organisms. Bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, were exposed to the sedimentable atmospheric particulate matter MPA-Se (1g L^{-1} , 96h) for analysis of metal/metalloid and biochemical biomarkers (oxidative stress, neurotoxicity and metabolism). After 96h of exposure, the water in the MPA-Se contained 18 of the 28 metals/metalloids detected in the MPA. Iron (Fe^{56}) and aluminum (Al) showed the highest concentrations, chromium (Cr), manganese (Mn), lead (Pb) and copper (Cu) increased 10 to 20 fold, titanium (Ti), vanadium (V), strontium (Sr), rubidium (Rb), cadmium (Cd), tin (Sn) and nickel (Ni) increased 1 to 3 fold compared to the control. The bioaccumulation of metals/metalloids in the exposure water varied significantly among the organs, with the muscle and liver showing the highest concentrations of metals, followed by the brain. Lipid peroxidation (LPO) and malondialdehyde (MDA) increased only in the muscle, while carbonyl proteins (PC) increased in the liver and brain. Regarding the enzyme nitric oxide synthase (NOS), there was an increase in the liver and brain in the group exposed to MPA-Se. Catalase (CAT) activity decreased in the liver and muscles, while glutathione peroxidase (GPx) activity increased in the liver and kidneys and decreased in muscle. Glutathione S-transferase (GST), responsible for detoxification, increased in the liver and decreased in muscles and kidneys. Cholinesterase (ChE) activity increased only in muscle. The results indicate oxidative stress due to oxidation catalyzed by metals present in MPA-Se. Regarding metabolism, there was an increase in the enzymes pyruvate kinase and phosphofructokinase (PK and PFK) in the liver, while in muscle there was an increase in hexokinase (HK) and a decrease in malate dehydrogenase (MDH), while in the brain there was an increase, the triglyceride metabolite decreased in the liver and brain, increased in muscle. The aminotransferases: alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) increased in the muscle, but alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), and glucose showed changes only in the brain and the protein showed no significant difference. With these results, it is possible to verify a picture of oxidative stress due to the presence of metals, components of MPA. Thus, the deleterious effects caused by MPA to tadpoles could be identified by biomarkers. Thus, the results contribute to the understanding that MPA-Se has a deleterious effect on the aquatic environment, negatively affecting bullfrog tadpoles, in different ways and levels in relation to the organs analyzed.

Keywords: black dust, frogs, stress markers, metabolism, ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Emissão e dissociação do Material Particulado Sedimentável (MPA-Se) no ambiente, sendo representadas na figura como esferas coloridas, em contato com organismos aquáticos..... 23
- Figura 2 – Esquema de ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos durante a produção de estresse oxidativo. Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), malondialdehyde (MDA), metallothionein (MT), cholinesterase (ChE), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), phosphate of nicotinamide adenine dinucleotide oxidized (NADP+), phosphate of nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADPH), deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA)..... 25
- Figura 3 – Esquema gráfico da ação das enzimas do metabolismo e metabólitos como glicose e triglicerídeos. Hexokinase (HK), glucose-6-phosphate (G6P), adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), fructose-6-phosphate (F6P), phosphofruktokinase (PFK), glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), 3-phosphoglycerate (3PG), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH), malate dehydrogenase (MDH), acetyl coenzyme A (AcetylCoA)..... 29
- Figura 4 – Pirâmide taxonômica indicando a localização da Ordem Anura e posição da espécie *Aquarana catesbeiana*..... 33
- Figura 5 – Girino de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* no estágio 25 de Gosner..... 34
- Figura 6 – Localização da Ilha do Boi no município de Vitória, estado do Espírito Santo (ES), Brasil (20°18'32"S, 40°16'33"O)..... 35
- Figura 7 – Esquema de aclimação e exposição dos girinos de rãs-touro, *Aquarana catesbeiana*, ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se), no período de 96h..... 36
- Figura 8 – Esquema da captação de material particulado atmosférico na região metropolitana da Grande Vitória – ES..... 144

Capítulo I

- Graphical Abstract..... 47
- Figure 1 – Concentration of metals in atmospheric particulate matter (APM, $\mu\text{g g}^{-1}$) (A), in the water of the control groups ($\mu\text{g L}^{-1}$) and in the group exposed to settleable atmospheric particulate matter (SePM, $\mu\text{g L}^{-1}$) (B). Values are expressed as mean \pm SE. N = 3. Limit of detection (LOD): Al: 0.10; Ti: 0.02; V: 0.05; Cr: 0.05; Mn: 0.38; Fe⁵⁶: 3.89; Ni: 0.06; Cu: 0.45; Zn: 0.17; As: 0.03; Se: 0.06; Nb: 0.237; Rb: 0.06; Sr: 0.09; Y: 0.003; Zr: 0.03; Nb: 0.15; Mo: 0.15; Ag: 0.02; Cd: 0.04; Sn: 0.07; Ba: 0.15; La: 0.0002; Ce: 0.002; W: 0.007; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.19; Bi: 0.12. Limit of quantification (LOQ): Al: 0.28; Ti: 0.05; V: 0.07; Cr: 0.09; Mn: 0.83; Fe⁵⁶: 4.59; Ni: 0.10; Cu: 1.09; Zn: 0.48; As: 0.09; Se: 0.15; Rb: 0.08; Sr: 0.22; Y: 0.004; Zr: 0.08; Nb: 0.37; Mo: 0.06; Ag: 0.05; Cd: 0.05; Sn: 0.2; Ba: 0.31; La: 0.0008; Ce: 0.002; W: 0.02; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.45; Bi: 0.28..... 56

Figure 2 – Carbonyl proteins (CP, nmol⁻¹ mg pt) levels in liver, muscle, kidney and brain of *Aquarana catesbeiana* from control (CTR) and exposed to settleable atmospheric particulate matter (SePM). Values are expressed as mean ± SE (n = 6-8). * P < 0.05; ** P < 0.01..... 66

Figure 3. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST) activities in liver, kidney and muscle; Cholinesterase activity (ChE) of the brain and muscle; Nitric oxide synthase (NOS) activity of the brain and liver; of *Aquarana catesbeiana* from control (CTR) and exposed to settleable atmospheric particulate matter (SePM). Values are expressed as mean ± SD. * P < 0.05; ** P < 0.01. (N = 6-8)..... 70

Capítulo II

Graphical Abstract..... 84

Figura 1. Fator de Bioconcentração (FBC) - nos órgãos de *A. catesbeiana* expostas por 96h à 1 g/L de MPA-Se. Os valores encontrados foram obtidos através da taxa da concentração de metais nos órgãos (ug/g) e da concentração de metais na água (ug/L)..... 91

Figura 2. Atividade enzimática da hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvatoquinase (PK), lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) em fígado, músculo, rim e cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana*, do controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se). Os valores são expressos como média D.P.M. (Desvio Padrão da Média). (n = 6-8). * P < 0,05..... 95

Figura 3. Atividade enzimática das aminotransferases: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) em fígado, músculo, rim e cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana*, do controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA Se). Os valores são expressos como média ± D.P.M. (Desvio Padrão da Média). (n = 6-8). * P < 0,05..... 98

Figura 4. Concentração de metais presentes na água do grupo controle e no grupo exposto ao MPA Se (µg.L⁻¹). Os valores são expressos em média±SE, com n=3. Limit of detection (LOD): Al: 0,10; Ti: 0,02; V: 0,05; Cr: 0,05; Mn: 0,38; Fe^{56,57}: 3,89; Ni: 0,06; Cu: 0,45; Zn: 0,17; As: 0,03; Se: 0,06; Nb: 0,237; Rb: 0,06; Sr: 0,09; Y: 0,003; Zr: 0,03; Nb: 0,15; Mo: 0,15; Ag: 0,02; Cd: 0,04; Sn: 0,07; Ba: 0,15; La: 0,0002; Ce: 0,002; W: 0,007; Hg^{201,202}: 0,07; Pb: 0,19; Bi: 0,12. Limit of quantification (LOQ): Al: 0,28; Ti: 0,05; V: 0,07; Cr: 0,09; Mn: 0,83; Fe^{56,57}: 4,59; Ni: 0,10; Cu: 1,09; Zn: 0,48; As: 0,09; Se: 0,15; Rb: 0,08; Sr: 0,22; Y: 0,004; Zr: 0,08; Nb: 0,37; Mo: 0,06; Ag: 0,05; Cd: 0,05; Sn: 0,2; Ba: 0,31; La: 0,0008; Ce: 0,002; W: 0,02; Hg^{201,202}: 0,07; Pb: 0,45; Bi: 0,28. Adaptado de Fernandes *et al.*, 2024..... 104

LISTA DE TABELAS

Table 1. Metal concentration in the organs of bullfrog tadpoles, liver, kidney, muscle and brain in the control and exposed groups to settleable particulate matter (SePM) ($\mu\text{g g}^{-1}$). $\uparrow\downarrow$ Increased or decreased compared to control. Values are expressed as mean \pm S.D.; N = 3. Limit of detection (LOD): Al: 0.10; Ti: 0.02; V: 0.05; Cr: 0.08; Mn: 0.38; Fe⁵⁶: 3.89; Ni: 0.06; Cu: 0.45; Zn: 0.17; As: 0.03; Se: 0.06; Rb: 0.06; Sr: 0.09; Y: 0.003; Zr: 0.03; Nb: 0.15; Mo: 0.02; Ag: 0.02; Cd: 0.04; Sn: 0.07; Ba: 0.15; La: 0.0002; Ce: 0.0007; W: 0.007; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.19; Bi: 0.12. Limit of quantification (LOQ): Al: 0.28; Ti: 0.05; V: 0.07; Cr: 0.09; Mn: 0.83; Fe⁵⁶: 4.59; Ni: 0.10; Cu: 1.09; Zn: 0.48; As: 0.09; Se: 0.15; Rb: 0.08; Sr: 0.22; Y: 0.004; Zr: 0.08; Nb: 0.37; Mo: 0.06; Ag: 0.05; Cd: 0.05; Sn: 0.02; Ba: 0.31; La: 0.0008; Ce: 0.002; W: 0.02; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.45; Bi: 0.28 58

Table 2. Bioconcentration Factor (BCF) in tissues of the bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana* exposed to 1 g L⁻¹ of SePM for 96 h. The BCF was calculated as the metal concentration in organs ($\mu\text{g g}^{-1}$) divided by the metal concentration in water ($\mu\text{g L}^{-1}$). (N = 3, both for tissues and water)..... 63

Table 3. Lipid peroxidation (LPO, nmol mg⁻¹ pt), Malondialdehyde (MDA, nmol mg⁻¹ pt) and metallothioneins (MT, nmol SH mg⁻¹ pt) levels in liver, kidney and muscle of *Aquarana catesbeiana* from control (CTR) and exposed to SePM (SePM). Values are expressed as mean \pm SE (n = 6-8). Values that are in bold show significant difference (p < 0.05) compared to the control..... 65

Capítulo II

Tabela 1 – Concentração de metabólitos: Glicose e Triglicerídeos (mg.dL⁻¹); Proteínas (mg pt L⁻¹) em fígado, músculo, rim e cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana*, do controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se). Os valores são expressos como média D.P.M. (Desvio Padrão da Média). (n = 6-8). * P< 0,05..... 96

Tabela 2 – Concentração de metal nos órgãos de girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, separados em dois grupos (N=3) sendo um controle e outro exposto ao MPA Se (1g L⁻¹). Adaptado de Fernandes *et al.*, 2024..... 101

Tabela 3 – Fator de Bioconcentração nos órgãos (fígado, rim, músculo e cérebro) em girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, expostos ao MPA Se (1g L⁻¹). Adaptado de Fernandes *et al.*, 2024..... 102

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amônio
AChE - Acetilcolinesterase
ADP – Adenosina Difosfato
Ag - Prata
Al - Alumínio
As - Arsênio
ATP – Adenosina Trifosfato
B - Boro
Ba - Bário
BHT – Hidroxitolueno butilado
Bi - Bismuto
Ca - Cálcio
Ca²⁺ - Cálcio
CaCO₃ – Carbonato de cálcio
CaSO₄ – Sulfato de cálcio
CAT - Catalase
Cd - Cádmiio
CDNB – 2,4 -Ditriclorobenzeno
CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA – Comitê de ética no uso animal
CL- Cloro
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr - Cromo
Cu - Cobre
DPM – Desvio padrão médio
DTNB – 5,5'- ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético
ERNS – Espécies reativas de nitrogênio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
F6P – Frutose-6-fosfato
Fe - Ferro
Fe⁵⁶ – Ferro (isótopo)
Fe⁵⁷ – Ferro (isótopo)
FMC - fumaça
G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH – Glutamato desidrogenase
GPx – Glutathione Peroxidase
GR – Glutathione reductase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
GST – Glutathione S-transferase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCl – Ácido Clorídrico
HClO – Ácido Hipocloroso
Hg²⁰¹ - Mercúrio
Hg²⁰² - Mercúrio
HK – Hexoquinase
HNO₃ – Ácido Nítrico

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
ICP-MS – Espectometria de massa por plasma acoplado indutivamente
K⁺ - Potássio
KCl – Cloreto de Potássio
KCN - Cianeto
KH₂PO₄ – Fosfato Monopotássio
La - Lantânio
LDH – Lactato desidrogenase
LPO - Lipoperoxidação
MDA - Malondialdeído
MDH – Malato desidrogenase
Mg²⁺ - Magnésio
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
Mn – Manganês
MP – Material Particulado
MPA – Material Particulado Atmosférico
MPASe – Material Particulado Atmosférico Sedimentável
MT – Metalotioneína
Na⁺ - Sódio
Na₂HPO₄ – Fosfato Dissódico
NaCl – Cloreto de Sódio
NAD⁺ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada
NADH+H⁺ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH – Hidróxido de sódio
Nb - Nióbio
NH₄ - Amônio
Ni - Níquel
NO₃⁻ - Nitrato
NOS – óxido nítrico sintase
NPs - Nanopartículas
O₂ - Oxigênio
Pb - Chumbo
PBS – Tampão Fosfato Salina
PCO – Proteínas Carbonilas
PEP - Fosfoenolpiruvato
PFK – Fosfofrutoquinase
PK – Piruvatoquinase
PM10 – Material Particulado <10µm
PM2,5 – Material Particulado <2,5 µm
PTS – Partículas em suspensão total
Rb - Rubídio
RMGV – Região Metropolitana da Grande Vitória
Se - Selênio
-SH - Sulfidril
Si - Silício
Sn - Estanho
SO₂ – Dióxido de Enxofre
SO₄²⁻ - Sulfato

SOD – Superóxido Dismutase
Sr – Estrôncio
Ta - Tântalo
TBA – Ácido Tiobarbitúrico
TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA – Ácido Tricloroacético
Ti - Titânio
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos
V - Vanádio
W –Tungstênio
XOD – Xantina oxidase
Y – Ítrio
Zn - Zinco
Zr – Zircônio

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Justificativa.....	19
2. Objetivos.....	200
3. Fundamentos teóricos	211
3.1. Material Particulado Atmosférico (MPA)	211
3.1.1 Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPA-Se).....	222
3.2. Estresse Oxidativo	24
3.3. Metabolismo	277
3.4. Modelo Experimental	31
4. Materiais e Métodos	34
4.1. Obtenção de amostras de material particulado atmosférico (MPA).....	34
4.2. Coleta e manutenção dos animais em Laboratório	34
4.3. Análise do material particulado atmosférico (MPA).....	36
4.4 Análise do material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se) na água	37
4.5 Análise do material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se) nos tecidos	37
4.6. Análises Bioquímicas	37
4.6.1. Homogeneização	37
4.6.2. Quantificação de Proteínas.....	38
4.6.3. Biomarcadores de estresse oxidativo	38
4.6.3.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	38
4.6.3.2. Atividade da catalase (CAT).....	38
4.6.3.3. Atividade da glutathione peroxidase (GPx).....	39
4.6.3.4. Atividade da glutathione S-transferase (GST).....	39
4.6.3.5. Quantificação de lipoperoxidação (LPO).....	39
4.6.3.6. Quantificação de proteínas carbonilas (PC).....	40
4.6.3.7. Quantificação de espécies reativas de ácido tiobasbitúrico (TBARS).....	40
4.6.3.8. Quantificação de Metalotioneína (MT).....	40
4.6.3.9. Atividade da Óxido Nítrico Sintase (NOS).....	41
4.6.4. Biomarcador de neurotoxicidade	41
4.6.4.1. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).....	41
4.6.5. Biomarcadores metabólicos	42
4.6.5.1. Aatividade da Hexoquinase (HK).....	42
4.6.5.2. Atividade da Fosfofrutoquinase (PFK).....	41

4.6.5.3. Atividade da Piruvatoquinase (PK)	412
4.6.5.4. Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)	412
4.6.5.5. Atividade da Malato Desidrogenase (MDH).....	422
4.6.5.6. Quantificação de Glicose.....	42
4.6.5.7. Quantificação de Triglicérides.....	423
4.6.5.8. Atividade da Alanina aminotransferase (ALT)	423
4.6.5.9. Atividade da Aspartato aminotransferase (AST).....	423
4.6.5.10. Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP).....	43
4.7. Procedimentos estatísticos.....	434
5. Resultados.....	445
<u>Capítulo I - Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, <i>Aquarana catesbeiana</i>, (Shaw, 1802).....</u>	46
<u>Capítulo II - Respostas metabólicas em girinos de rãs-touro, <i>Aquarana catesbeiana</i> (Shaw, 1802), induzidas pela exposição ao material particulado atmosférico sedimentável</u>	84
6. Considerações Finais	116
7. Referências.....	118
ANEXO 1.....	14144
ANEXO 2	145

1. Introdução

As atividades antrópicas têm impactado seriamente e de forma constante o meio ambiente, visto que são alvos da poluição produzida por indústrias, agronegócio, queima de combustíveis e o aumento constante da utilização de veículos e transportes automotores (Rodrigues, 2006, Gokul *et al.*, 2023; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2024), modificando a qualidade do ar, água e conseqüentemente, afetando a saúde de seres humanos, fauna e flora das regiões afetadas (Oliveira, 2017; Souza, Sadauskas-Henrique, 2022).

No que se refere à qualidade do ar, a poluição atmosférica pode acontecer em decorrência da formação de material particulado (MP) a partir de gases como o dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), monóxido de carbono (CO) e agrotóxicos (WHO, 2005), além de complexos proteicos e materiais orgânicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), sendo uma mistura complexa de partículas de diversos tamanhos, formas e composição química (Schneider, *et al.* 2005; Nääv *et al.*, 2020; Bhattarai *et al.*, 2024). O MP também pode levar à contaminação terrestre (Alves *et al.*, 2015) e aquática (Boonyatumanond *et al.*, 2006; Kowalski *et al.*, 2016; Sousa, Sadauskas-Henrique, 2022). De acordo com Anderson *et al.* (2012) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 491/2018) os MP são classificados em diferentes tamanhos: partículas totais em suspensão (PTS), com diâmetro inferior a 50 µm; MP₁₀: partículas inaláveis, com diâmetros geralmente de 10 µm e menores; e MP_{2,5}: partículas finas inaláveis, com diâmetros geralmente de 2,5 µm e menores e partículas sedimentáveis, que constituem as partículas que se depositam nas superfícies.

No Brasil, o Material Particulado Atmosférico (MPA) tem grande influência das atividades minero-siderúrgicas, as quais em sua maioria são desenvolvidas em áreas populosas, levando os moradores ao contato com material metálico ali processado (Cakmak *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2017), como é possível notar na cidade Vitória-ES, onde a população vem sofrendo com a deposição desse MPA diariamente emitido pelas empresas localizadas nos complexos portuários alocados na região. Desta forma, a contaminação via partículas atmosféricas tem impacto na população local que pode absorver o material diretamente via respiração (Santos; Reis, 2011; Cakmak *et al.*, 2014; Vanos; Hebborn; Cakmak, 2014; Santos *et al.*, 2017). O MP, que se deposita nas superfícies, denominado de material particulado

atmosférico sedimentável (MPA-Se), pode ser dissociado em meio líquido em metais e nanopartículas metálicas (Arrivabene *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2021a; Souza *et al.*, 2021b; Souza *et al.*, 2021c; Fan *et al.*, 2023) e ter efeitos nos ecossistemas aquáticos, sendo ingerido e acumulado nos tecidos de organismos aquáticos (Kowalski *et al.*, 2016; Sousa, Sadauskas-Henrique, 2022; Arrivabene *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2022; Gokul *et al.*, 2023). Entretanto, estudos sobre os efeitos que o MPA-Se podem causar no ambiente aquático e na biota ainda são escassos (Fan *et al.*, 2023; Duarte *et al.*, 2023; Fortes *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2023; Soares *et al.*, 2024). Por exemplo, espécies metálicas do MP transportadas pelo ar podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) provocando estresse oxidativo em diferentes organismos de diversos ambientes, (Magnani *et al.*, 2016; Shuster-Meiseles *et al.*, 2016; Moretti *et al.*, 2019) e, no ambiente aquático efeitos em girinos, como estresse oxidativo, (da Costa *et al.*, 2024; Fernandes *et al.*, 2024) e peixes (Souza *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2021b).

O processo de estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e de nitrogênio (ERNs), sua eliminação do organismo pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Ferreira *et al.*, 2010; Lushchak, 2014). Tanto as EROs como as ERNs desempenham papel fisiológico no organismo, na sinalização celular, na apoptose e na resposta imunológica a agentes patogênicos (Vasconcelos *et al.*, 2007). O contaminante, especificamente o MP, em contato com o organismo pode iniciar um processo fisiopatológico que pode gerar o estresse oxidativo com demanda de energia (Radhakrishnan, Hemalatha, 2009; Carvalho *et al.*, 2012, 2015). Os processos metabólicos de uma maneira geral exibem uma estreita relação com as condições em que o ambiente se encontra, como baixas/altas temperaturas, escassa disponibilidade de alimento ou de recursos hídricos, além da presença de xenobióticos que alteram a atividade de enzimas e concentrações de metabólitos (Bícego *et al.*, 2007; Zena *et al.*, 2016; Longhini *et al.*, 2017). A atividade das enzimas glicolíticas hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e lactato desidrogenase (LDH) pode ser afetada por exposição a metais (Levesque *et al.*, 2002; Moniruzzaman *et al.*, 2020). Estas enzimas são essenciais na manutenção do aporte energético e na manutenção dos tecidos e, alterações na sua atividade podem prejudicar o desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e reprodução de organismos aquáticos (Levesque *et al.*, 2002; Chagas *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022; Gashkina, 2024; Zhang *et al.*, 2024).

Essas enzimas podem ser observadas em anfíbios, que são sensíveis a presença de contaminantes no ambiente, já que apresentam pele vascularizada devido a respiração cutânea

realizada por esses animais (Wolkovicz *et al.*, 2013). A utilização da espécie *Aquarana catesbeiana* (syn. de *Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802) como bioindicador se dá pela facilidade experimental, visto que é uma espécie de fácil manutenção laboratorial e adaptação, onde seus indivíduos tem bons tamanhos para experimentação, na fase larval podem chegar a 12 cm e na fase adulta a 30 cm, sendo um organismo modelo utilizado para avaliação de efeitos deletérios em ensaios ecotoxicológicos, devido o seu ciclo de vida bifásico e pele permeável tanto para contaminações terrestres como aquáticas (Ryan, 1980; Braga, 2001; França-Salgueiro, 2013; Chai *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2021; Utsunomiya *et al.*, 2022).

Neste sentido, os efeitos da contaminação nos organismos por meio da avaliação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos é importante, pois permite verificar os possíveis impactos causados pela exposição ao MPA (Duarte *et al.*, 2023; Soares *et al.*, 2024) e verificar o nível de dano funcional causado pelo acúmulo de constituintes do MPA-Se (Ballesteros *et al.*, 2009; França-Salgueiro, 2013; Gosset; Ferro; Durrieu, 2016; Nüßer *et al.*, 2016; Chaousis; Leusch; Merwe, 2018).

1.1. Justificativa

O estado do Espírito Santo - ES está localizado na região sudeste do país, tendo como delimitação os estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia, além de ser banhado pelo oceano Atlântico. Tem como foco econômico a agricultura, extrativismo, importação do minério de ferro para exportação, e também indústrias siderúrgicas e metalúrgicas, o turismo é bem desenvolvido pela região litorânea, fazendo com que o comércio tenha grande desenvoltura (Governo do Estado do Espírito Santo, 2024).

Devido à localização do estado do Espírito Santo a infraestrutura portuária é muito bem desenvolvida e utilizada, com cerca de 10 terminais e 2 complexos, o Complexo do Porto de Vitória e o Complexo de Tubarão (CODESA, 2018; Governo do Estado do Espírito Santo, 2024). Sendo uma grande região metropolitana, o estado também traz grandes, médias e pequenas indústrias, localizadas em uma macrorregião chamada Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV). As empresas como a Vale e ArcelorMittal, localizadas no complexo de Tubarão, emitem uma espécie de fumaça metálica chamada pela população local de “pó preto” (Governo do Estado do Espírito Santo, 2024). Poucos estudos relatam os efeitos do MPA em peixes (Souza *et al.*, 2019, 2021, Fortes *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2023; Soares *et al.*, 2024) e, em relação aos anfíbios, não é diferente, há uma lacuna de estudos que relacionam o MPA aos anfíbios (Yang *et al.*, 2020; da Costa *et al.*, 2024, Fernandes *et al.*, 2024). Mostrando que uma defasagem de informações sobre a relação de anfíbios e material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se), mostrando quais efeitos a exposição a esse material podem causar.

A contaminação do ambiente aquático por metais bem como sua influencia e toxicidade na biota tem recebido atenção nas últimas décadas da comunidade científica e da população. Diante do exposto, para compreender e verificar as ações que o MPA-Se causa na biota aquática, este estudo traz as seguintes hipóteses: (1) o MPA contém metais potencialmente tóxicos, em concentrações superiores ao permitido pela legislação brasileira; (2) a presença do MPA altera os biomarcadores bioquímicos associados ao estresse oxidativo [Metalotioneína (MT), Proteínas Carbonilas (PCO), Lipoperoxidação (LPO), Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione S-transferase (GST), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT)], neurotoxicidade [Acetilcolinesterase (AChE) e óxido nítrico sintase (NOS)] e ao metabolismo [Hexoquinase (HK), Fosfofrutoquinase (PFK), Piruvatoquinase (PK), Lactato desidrogenase (LDH), Malato desidrogenase (MDH), alanina

aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), proteína, glicose e triglicérides)] nos órgãos de girinos de rãs-touro e (3) os órgãos de girinos acumulam diferentemente o MPA-Se de acordo com a função que desempenham.

2. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição aguda do MPA-Se nos girinos de rã-touro, *Aquarana castebeiana*, por meio dos biomarcadores bioquímicos, além de determinar os metais/metaloídes presentes no MPA e no MPA-Se. De forma específica, os objetivos foram:

- a) Verificar e identificar metais/metaloídes no MPA e no MPA-Se;
- b) Determinar as concentrações do MPA-Se nos órgãos dos girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* no fígado, rim, músculo e cérebro;
- c) Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo nos órgãos selecionados;
- d) Avaliar os biomarcadores de metabolismo e metabólitos no fígado, rim, músculo e cérebro;
- e) Verificar a diferença de concentração do MPA-Se e dos biomarcadores no fígado, rim, músculo e cérebro;
- f) Correlacionar os biomarcadores com o MPA-Se e metais/metaloídes de sua composição;

3. Fundamentação teórica

3.1. Material Particulado Atmosférico (MPA)

O material particulado (MP) é descrito pela Agência de Proteção Ambiental Americana - US-EPA (2023) como uma combinação de partículas extremamente pequenas e/ou gotículas de líquidos, constituído por uma variedade de componentes, tais como ácidos, nitratos, sulfatos, compostos orgânicos, metais e partículas de solo ou poeira. A CETESB (2021) descreve o MP como concentração de poluentes formados de poeiras, fumaças e material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera devido o seu pequeno tamanho. A emissão de MP para a atmosfera tem origem a partir dos veículos automotores, processos industriais, queima de biomassa, ressuspensão de poeira do solo, entre outros (Junior *et al.*, 2013; Brito, Araújo, Silva, 2018; CETESB 2021).

De composição diversificada, o MP pode conter poeira mineral, metais, metalóides, sais marinhos, íons inorgânicos solúveis em água, como os íons Na^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , compostos orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), carbono elementar (Murillo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Deshmukh *et al.*, 2013; Daher *et al.*, 2013; Ancelet *et al.*, 2013). No MP inalável (MP_{10}) encontram-se prevalentemente em sua formação: solo suspenso ou poeira advindos da rua; cinzas de combustão incompleta de carvão, óleo e madeira; nitratos/cloretos/sulfatos de reações de HNO_3 , HCl , SO_2 , óxidos de elementos da crosta terrestre (Si, Al, Ti, Fe), sais de CaCO_3 , CaSO_4 , NaCl , sal marinho; pólen, fungos, esporos de fungos; fragmentos de fauna e flora; desgaste de pneus e pavimentos de estradas (Wilson *et al.*, 1997; Mendonça, 2010; Souza *et al.*, 2010; Santos, 2018). O MP inalável fino ($\text{MP}_{2,5}$) é formado principalmente por íons de sulfato, nitrato, amônio e hidrogênio; carbono elementar; variedade de compostos orgânicos; metais, compostos de Pb, Cd, V, Ni, Cu, Zn, Mn e Fe (Bouh *et al.*, 2010; Gidney *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Brito, Araújo e Silva, 2018).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a partir da resolução CONAMA nº 491/2018, em seu artigo segundo, define poluente atmosférico, padrão de qualidade do ar, episódio crítico de poluição, índice de qualidade do ar (IQAR) que são importantes definições acerca do assunto, onde traz também valores dos poluentes que são monitorados com constância como: Material particulado inalável (MP_{10}), Material particulado inalável fino ($\text{MP}_{2,5}$), dióxido de enxofre (SO_2), dióxido de nitrogênio (NO_2), ozônio (O_3), fumaça, monóxido de carbono (CO), partículas totais em suspensão e etc (BRASIL, 2018).

Segundo informações do inventário da Região da Grande Vitória, as emissões de MP minero-siderúrgicos correspondem a 68% do MP, 70,4% do MP₁₀ e 71,6% do MP_{2.5}. Além do setor industrial, as produções minerais e a parte da construção civil também apresentaram significativa contribuição, 11,0% do MP₁₀ e 7,4% de MP_{2.5} (ECOSOFT, 2019).

O estado do Espírito Santo - ES está localizado na região sudeste do país, tendo como delimitação os estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia, além de ser banhado pelo oceano Atlântico. Tem como foco econômico a agricultura, extrativismo, importação do minério de ferro para exportação, e também indústrias siderúrgicas e metalúrgicas, o turismo é bem desenvolvido pela região litorânea, fazendo com que o comércio tenha grande desenvoltura (Governo do Estado do Espírito Santo, 2024).

Vários estudos demonstraram que as nanopartículas (NPs), presentes no MPA, podem se desagregar e serem assimiladas pelas células, tecidos e corrente sanguínea (Gnach *et al.*, 2015; Bakand; Hayes, 2016; Panzarini *et al.*, 2018; Zhao; Stenzel, 2018; Souza *et al.*, 2019). Um estudo realizado por Souza *et al.* (2019) mostrou que o MPA coletado no entorno da cidade de Vitória (ES), era formado por aglomerados de partículas de aproximadamente 100 µm, sendo este MPA a principal fonte de poluição atmosférica na área. Além disso, Souza *et al.* (2019) demonstraram que as NPs foram incorporadas por diferentes tecidos de uma espécie nativa de peixe estuarino, *Centropomus parallelus*. Estes estudos mostram também que, após a dissociação e fragmentação do MPA, ainda não se tem conhecimento do destino e dos efeitos e, tampouco sobre seu impacto nos organismos aquáticos.

3.1.1 Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPA-Se)

Em relação ao MP Atmosférico Sedimentável (MPA-Se), também nominado poeira sedimentável ou partícula sedimentável, segundo a Norma Brasileira NBR 12065 de março de 1991, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ANEXO A), é estabelecido como a poeira presente na atmosfera, suscetível à coleta por sedimentação livre, composta de partículas sólidas ou líquidas que sejam de forma suficiente grandes para se depositarem no frasco coletor e ao mesmo tempo, pequenas para atravessarem a peneira de 0,84 mm (20 *mesh*) (ABNT, 1991).

O MPA-Se, quando em solução de água como solvente, ou semelhante, pode se separar em metais e nanopartículas metálicas (< 200 nm) contaminando os ambientes e a biota aquática do local (De Angelis *et al.*, 2022; Soares *et al.*, 2022), como pode ser exemplificado na Figura 1. Essa dissociação na água facilita o contato com o ecossistema, visto que os metais e/ou nanopartículas em água tem absorção facilitada.

O “pó preto”, ou material particulado atmosférico (MPA), depositado no ambiente aquático passa a ser denominado de material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se), é gerado de atividades como: exportação e pelotização de minério de ferro, movimentação de derivados de petróleo e de produtos siderúrgicos (ferro, gusa, mármore e veículos), de recepção, manuseio e armazenagem de grãos e fertilizantes (Governo do Estado do Espírito Santo, 2024). Em sua constituição pode apresentar diferentes tipos de metais/metaloídes como: B, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Sn, Ba, La, Ce, Hg e Pb, e partículas com tamanho ≤ 100 nm, sendo caracterizada como nanopartícula (NP) (Souza *et al.*, 2021a; De Angelis *et al.*, 2022; Galvão *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2023; Fernandes *et al.*, 2024).

Figura 1 – Emissão e dissociação do Material Particulado Sedimentável (MPA-Se) no ambiente, sendo representadas na figura como esferas coloridas, em contato com organismos aquáticos



Fonte: Autora

A deposição do MPA-Se na região do ES é de 16 g/m^2 , mensalmente (Santos *et al.*, 2017) ainda que não existam normas, leis ou regimentos que especifiquem limites ambientalmente seguros para deposição na água, o CONAMA na resolução nº 491/18 designa padrões para qualidade do ar, com níveis médios máximos de $\text{MP}_{2,5}$ sendo $20 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ porém, essa norma foi revogada pela resolução nº 507/24 em alguns pontos, pretendendo que a deposição chegue na casa $5 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ (até o ano de 2044), se assemelhando ao estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que também estabelece $5 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ ambos anualmente. Enquanto os estados do Espírito Santo no decreto 3463-R de 2013 e Minas Gerais na deliberação normativa nº1/81, estabelecem, por ano, $10 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ para $\text{MP}_{2,5}$ e o Rio de Janeiro, por meio do decreto 48668/23 estabelece $20 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ anualmente. Esse desacordo com as

legislações vigentes, demonstra uma necessidade de adaptação e verificação do ambientalmente seguro para seres humanos, fauna e flora.

3.2. Estresse Oxidativo

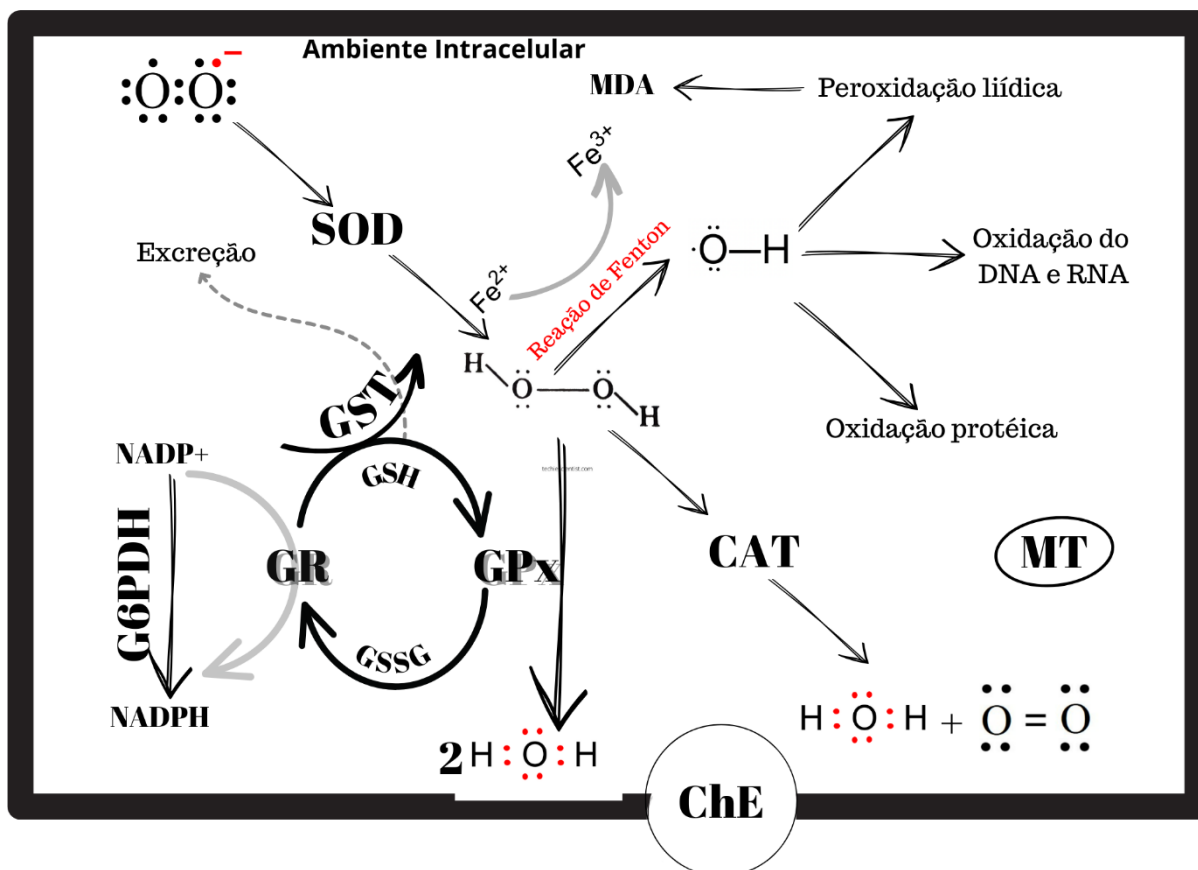
Devido a sua composição, contendo agentes nocivos o MPA/MPA-Se pode induzir condições prejudiciais aos seres vivos expostos. Por exemplo, pela indução ao estresse oxidativo, podendo acarretar mudanças fisiológicas e comportamentais, uma vez que o estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a produção de EROs/ERNs e seu combate se dá por uma resposta do sistema antioxidante dos organismos (Barbosa *et al.*, 2010; Gottlieb *et al.*, 2011; Velloso *et al.*, 2021).

Nos vertebrados, a forma utilizada para combater os radicais livres, são as vias de proteção antioxidante de extrema complexidade, que se originam durante o metabolismo celular, e também em diversas circunstâncias patológicas. O estresse oxidativo ocorre quando essas vias estão em desequilíbrio, resultado da oxidação de moléculas biológicas (Machado *et al.*, 2009; Rajedran, 2014; Pisoschi, Pop, 2015).

Os metais podem induzir a geração de EROs, causando o chamado estresse oxidativo, como exemplo destacam-se as radicalares: hidroxila (HO), superóxido (O_2^-), peroxila (ROO) e alcoxila (RO) e as não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO), os quais são altamente reativos e tóxicos para macromoléculas celulares e podem causar dano oxidativo de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Halliwell, 2000; Valko *et al.*, 2006; Birben *et al.*, 2012).

Para prevenir, conter ou neutralizar o excesso de radicais os organismos utilizam o sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Figura 2). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) compõem o sistema antioxidante enzimático e se encarrega, de manter o balanço redox e neutralizar as EROs. Assim um aumento do estresse oxidativo pode ocasionar a falha desse sistema de defesa contra as EROs (Birben *et al.*, 2012; Nwani *et al.*, 2016).

Figura 2 – Esquema de ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos durante a produção de estresse oxidativo. Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST), glutaciona (GSH), glutaciona dissulfeto (GSSG), malondialdeído (MDA), metalotioneíán (MT), colinesterase (ChE), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NADP+), fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADPH), ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA).



Fonte: Autora, adaptado de Ferreira *et al.*, 2009

Portanto, a toxicidade do metal pode levar a alterações na regulação oxidativa de enzimas antioxidantes. A SOD e a CAT são consideradas a linha de frente do sistema antioxidante, onde a SOD transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. Já a CAT e a GPx impedem o acúmulo de H_2O_2 , sendo que a CAT é responsável pela degradação do H_2O_2 , produzido no metabolismo celular e na oxidação, formando como subprodutos água e oxigênio (Martins *et al.*, 2005). A GPx, é uma enzima presente nos tecidos animais que catalisa a redução do H_2O_2 (em concentrações mais baixas) e de hidroperóxidos orgânicos a água ou outros produtos menos reativos associados a glutaciona reduzida (GSH)

(Halliwell; Gutteridge, 2007; Pisoschi; Pop, 2015). A GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de glutathiona oxidada (GSSG), na presença de coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (Deponete, 2013). Estas enzimas protegem o organismo contra os efeitos adversos do estresse oxidativo atuando diretamente contra as EROs ou reparando os danos causados por estes radicais (Israr *et al.*, 2011; Deponete, 2013; Rainio *et al.*, 2013).

A GST participa nos processos de desintoxicação e, associada a GSH, ela catalisa a combinação de vários compostos em situações que o organismo estiver reagindo formando compostos mais solúveis em água para serem excretados (Camargo e Martinez, 2006). Desta forma, a atividade aumentada das enzimas SOD, CAT e GST pode indicar efeito protetor contra EROs no organismo exposto ao toxicante prevenindo os efeitos desses radicais (Peltzer *et al.*, 2013; Sotomayor *et al.*, 2015; Ighodaro; Akinloye, 2017; Lima *et al.*, 2021).

O estresse oxidativo pode levar a formação de peróxidos de lipídeos ou lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (CP). A LPO é uma reação que acontece em cadeia e leva a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e à destruição celular, ocasionando o estresse oxidativo (Van Der Oost *et al.*, 2003). As EROs podem reagir com ligações duplas dos PUFAs para produzir hidroperóxidos lipídicos, como o malondialdeído (MDA), por exemplo, que é o produto de oxidação secundária dos PUFAs peroxidados, os quais possuem efeitos mutagênicos e citotóxicos (Sung *et al.*, 2013).

As proteínas carbonilas são indicadores de dano oxidativo grave nas proteínas celulares, por serem quimicamente estáveis. Assim, as alterações da função celular, muitas vezes causadas por xenobióticos que induzem a produção de EROs, são resultantes da oxidação das moléculas de proteínas (Modesto, Martinez, 2010; Georgescu *et al.*, 2018).

As metalotioneínas (MTs) estão inseridas em uma família de proteínas que participam do processo de regulação do Zn e do Cu e são induzidas pela exposição a metais (Falfushynska *et al.*, 2015). Elas são caracterizadas por sua baixa massa molecular e podem ser encontradas em diversos organismos do Reino Animal (Loumbourdis *et al.*, 2007). Sua característica principal se encontra na composição de cisteína em proporção elevada (cerca de 30%), que permite sua ligação aos metais, impedindo ou diminuindo a formação de EROs em vertebrados (Van der Oost *et al.*, 2003; Loumbourdis *et al.*, 2007; Falfushynska *et al.*, 2015). Devido às suas características, as MTs estão de forma frequente envolvidas na função de desintoxicar elementos metálicos e manter a homeostase intracelular (Albuquerque, 2007; Azevedo *et al.*, 2021). Desta forma, as MTs sinalizam a presença de metais e podem ser indicadores importantes de contaminação e ativação de vias de depuração.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que hidrolisa a acetilcolina (ACh), em colina e ácido acético. A ACh é um neurotransmissor que atua nas sinapses nervosas controlando os movimentos musculares e prevenindo a superestimulação pós-sináptica. Devido a sensibilidade aos metais, a sua atividade pode ser inibida, possibilitando a verificação dos primeiros efeitos da contaminação nos organismos, como descrito em moluscos bivalves (Albuquerque, 2007; Azevedo *et al.*, 2021; Dos Santos *et al.*, 2022). Outros contaminantes ambientais também demonstraram efeitos sobre a atividade da AChE, como Boccioni *et al.* (2022) analisaram a toxicidade do glifosato e glufosinato de amônio em girinos de forma individual e combinada, mostrando que os níveis de AChE aumentaram quando expostos ao glifosato. Peluso *et al.* (2023) que analisaram o impacto causado pela agropecuária em *Rhinella arenarum*, e verificaram que os biomarcadores de neurotoxicidade apresentaram valores alterados em diferentes pontos de um riacho, em Buenos Aires, indicando um efeito neurotóxico, pelo aumento da AChE. Portanto, a atividade da AChE constitui um importante indicador de neurotoxicidade em organismos.

A enzima óxido nítrico-sintase (NOS) sintetiza o radical livre óxido nítrico (NO) com o consumo de NADPH e O₂ (Knowles *et al.*, 1994; Feihl *et al.*, 2001). O NO atua em importantes processos fisiológicos como transmissão neural, regulação do tônus, crescimento entre outros (Dimmeler *et al.*, 1997; Kanwar *et al.*, 2009). Entretanto, o NO pode reagir rapidamente com outros radicais, tais como o oxigênio e o anion superóxido e também com metais de transição (Fe²⁺- NO⁺) produzindo ERNs [N₂O₃, dióxido de nitrogênio - NO₂, NO₂⁻, NO₃⁻, anion peroxinitrito (OONO⁻) e adutos metal-nitrosil (Miranda *et al.*, 2000; Wink *et al.*, 2001; Arasimowicz, Floryszak-Wieczorek, 2014).

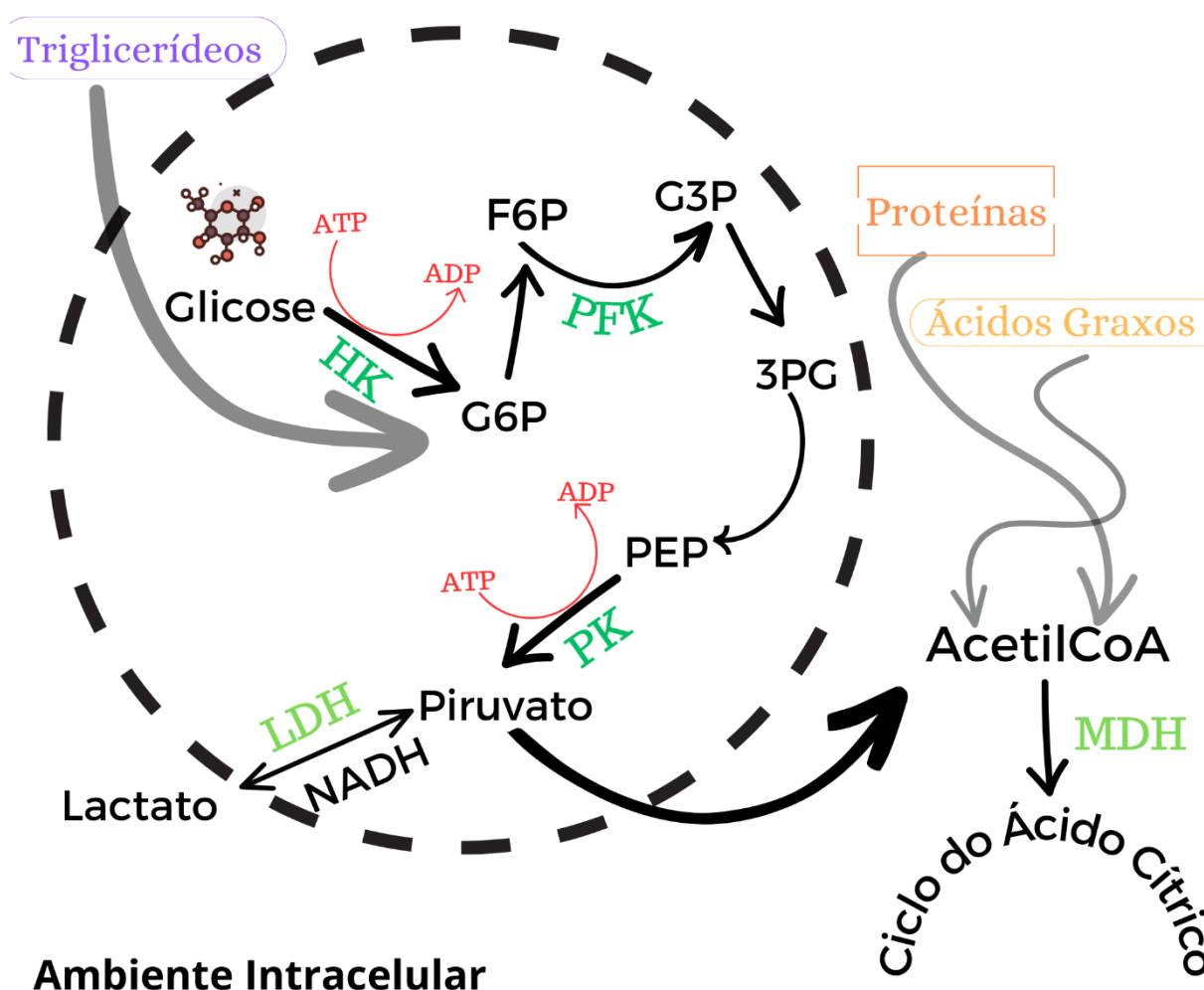
3.3. Metabolismo

Como a formação de EROs/ERNs ocorre de forma natural nas células, pode haver interferências desses radicais livres nesse metabolismo, definido como toda reação bioquímica que ocorre no interior da célula, podendo envolver micro e macromoléculas para otimização desse processo, que pode ser classificados em anabolismo e catabolismo (Silverthorn, 2003a; Widmaier; Raff; Strang, 2013a; Simões *et al.*, 2014).

A manutenção de energia nas células envolve a participação de enzimas que realizam reações de síntese (anabolismo) e de degradação (catabolismo) (Figura 3). Estas reações envolvem mobilização de glicogênio, glicose, lipídeos e proteínas levando a formação de trifosfato de adenosina (ATP) (Motta, 2003; Geurden *et al.*, 2007; O'neill, Kishton, Rathmell,

2016; Nelson, Cox, 2018). As enzimas regulatórias, hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) regulam a velocidade das reações da via glicolítica, catalisam reações irreversíveis e suas atividades são controladas por substratos, produtos metabólicos e coenzimas (Berg *et al.*, 2002; Hermann-Kleiter *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2019; Olson *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2022).

Figura 3 – Esquema gráfico da ação das enzimas do metabolismo e metabólitos como glicose e triglicerídeos. Hexoquinase (HK), glicose-6-fosfato (G6P), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), frutose-6-fosfato (F6P), fosfofrutoquinase (PFK), gliceraldeído-3-fosfato (G3P), 3-fosfoglicerato (3PG), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvatoquinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), malato desidrogenase (MDH), acetilcoenzima A (AcetilCoA).



Fonte: Autora, adaptado de Wiley & Sons, 2006

A oxidação da molécula de glicose ocorre na maioria dos seres vivos sendo a principal fonte de energia. As hemácias e células nervosas, por exemplo, utilizam, exclusivamente, a glicose para produção de energia (Campbell, 2004). A utilização da glicose (glicólise) ocorre primeiramente no citosol por ação da enzima hexoquinase (HK). A HK fosforila a glicose com o consumo de uma molécula de ATP e produção de glicose-6-fosfato e ADP (González Alvarez *et al.*, 2009; Nelson; Cox, 2018), a glicose-6-fosfato, é utilizada como substrato em várias vias metabólicas (Li *et al.*, 2014). As enzimas fosfofrutoquinase (PFK) e piruvatoquinase (PK) regulam a glicólise na fase inicial e na fase final, respectivamente. A PFK é responsável por catalisar a fosforilação da frutose-6-fosfato utilizando uma molécula de ATP e a PK realiza a transferência catalítica de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP, formando uma molécula de piruvato e uma de ATP (Nelson; Cox, 2018). Essas três enzimas citadas acima (HK, PFK e PK) atuam no controle da via glicolítica, sendo reguladas pelos seus substratos, cofatores e produtos (Mulukutla *et al.*, 2010; Sola-Penna *et al.*, 2010). Variações no nível de atividade destas enzimas são observadas em estudos com peixes, relacionados a perturbações ambientais. Os organismos demonstram implicações como prejuízos na sua via metabólica com efeitos na demanda energética devido a exposição à xenobióticos (Treberg *et al.*, 2007; Polakof *et al.*, 2012; Mulukutla *et al.*, 2014).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que não participa da via glicolítica, mas atua no piruvato que é o último substrato formado nesta via (Nelson; Cox, 2018). A LDH catalisa de forma reversível, a reação de transformação do piruvato em lactato com oxidação da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida/oxidada ($\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$), a qual vai doar ou receber íons hidrogênio (Motta, 2000; Nelson; Cox, 2018). A forma oxidada da coenzima é essencial para a complementação da via glicolítica para a formação de 1,3 difosfoglicerato a partir de gliceraldeído 3-fosfato dando continuidade na glicólise na ausência de oxigênio (Nelson; Cox, 2018). Outra enzima importante no metabolismo é a malato desidrogenase (MDH), que catalisa a interconversão de malato e oxaloacetato com redução concomitante de NAD^+ ou oxidação de NADH, esta enzima pode atuar tanto em condições aeróbias (malato-oxalacetato) como anaeróbias (oxalacetato-malato) (Ribeiro *et al.*, 2015). Ademais, a MDH também pode participar nas vias de síntese de lipídeos (lipogênese) e na nova síntese de glicose (gliconeogênese) (Almeida *et al.*, 2016; Nelson; Cox, 2018; Chagas *et al.*, 2020).

Os triglicerídeos, formados por glicerol e ácidos graxos, representam reservas energéticas que se acumulam, principalmente, no tecido adiposo (Campbell, 2004). Pesquisas

demonstraram que variações nas concentrações de triglicérides podem estar associadas a um transtorno no metabolismo de gorduras devido a presença de contaminantes ambientais em anfíbios (Higley *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2016; Chagas *et al.*, 2020). No estudo de Utsunomiya *et al.* (2022), foi demonstrado que girinos de rã-touro expostos à água do Rio Sorocaba em períodos diferentes do ano, apresentaram diminuição de triglicérides no fígado no inverno, enquanto no verão aumentaram. Os autores atribuíram estas variações a presença dos metais no rio com aumento na produção de ATP para auxiliar nos processos de desintoxicação.

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) atuam na transferência reversível dos grupamentos amina dos aminoácidos para o alfa-cetoglutarato, formando o ácido glutâmico e piruvato ou oxaloacetato. Essas reações são essenciais na síntese e degradação de aminoácidos e atuam em associação com o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (Motta, 2003; Peltzer *et al.*, 2024) tendo efeitos indiretos no metabolismo das proteínas e dos carboidratos. A AST, anteriormente chamada de transaminase glutâmico-oxalacética (GOT), é responsável por catalisar a transaminação de aspartato e 2-cetoglutarato em oxalacetato e o glutamato de forma reversível, enquanto a ALT ou glutamato-piruvato transaminase (GPT), transfere grupos amina da alanina para o cetoglutarato, produzindo o glutamato e o piruvato. Estas enzimas estão principalmente ligadas ao fígado e exercem um papel essencial no metabolismo da glicose e na desintoxicação de radicais (Kumar *et al.*, 2018; Peltzer *et al.*, 2024). O aumento na atividade destas enzimas pode indicar danos nos tecidos devido a um estresse oxidativo provocado pela presença de contaminantes no ambiente (Prashanth; Neelagund, 2008; Loteste *et al.* 2013; Attademo *et al.*, 2021). Destacam-se os estudos com o peixe, *Pangasius hypophthalmus* expostos a altas concentrações de Se (4,5 a 6,0 mg/L) e Se-NPs (2,5 a 4,0 mg/L) que tiveram alteração na atividade da ALT e AST e alterações histopatológicas no fígado e brânquias (Kumar *et al.*, 2018) e em girinos de *Rhinella arenarum* expostos ao Li (2,5 a 20 mg/L, 7 a 14 dias) que apresentaram aumento da ALT e AST (Peltzer *et al.*, 2024). Outros estudos relataram atividades aumentadas de AST e ALT, em peixes após exposição ao nitrato de chumbo, um metal potencialmente tóxico e ao herbicida Roundup (Malarvizhi *et al.*, 2012; Mary *et al.*, 2014; Panetto *et al.*, 2019).

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que hidrolisa ésteres de ácido fosfórico em ambiente alcalino. A ALP tem papel importante na imunidade não específica e alguns estudos relacionam a sua atividade como biomarcador de detecção dos lisossomas e poluentes (Mazorra *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2020). Por exemplo, girinos de *Rhinella arenarum* expostos a

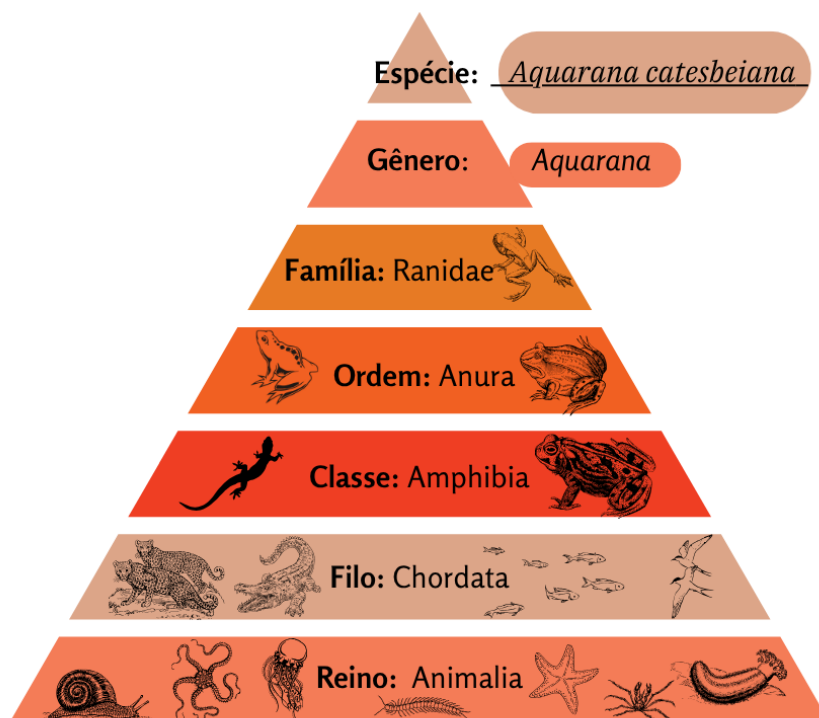
microplásticos, como polietileno e tetrabromobisfenol, (por 30 dias) tiveram uma ampliação da sua atividade da ALP (Attademo *et al.*, 2022). Outros estudos demonstraram também a participação da ALP nos processos de regeneração da cauda de girinos, *Rhinella marina* (syn. de *Bufo marinus*) (Junqueira, 1950) e em *Rana pipiens* (Fry *et al.*, 1973). Colosio *et al.* (2021) demonstraram que a ALP atua nos diferentes locais do osso e estágios de vida de girinos e adultos de *Aquarana catesbeiana*. Os resultados destes estudos sugerem uma relação entre a ALP, crescimento, regeneração das caudas e ossificação nos processos de metamorfose dos anfíbios.

3.4. Modelo Experimental

Os anuros são considerados importantes bioindicadores da qualidade do ambiente, por apresentarem ciclo de vida bifásico, com alternância de um estágio larval aquático para um adulto terrestre, elevada permeabilidade cutânea com extensa vascularização da pele devido à respiração também cutânea, além da pulmonar, e ovos sem casca permitindo que compostos químicos presentes na água, solo ou no ar sejam absorvidos mais facilmente (Degarady; Halbrook, 2006; Vences; Köhler, 2008; Catenzzi, 2015; Brodeur; Candioti, 2017). Devido a essas características descritas, associadas à capacidade de bioacumulação e a sensibilização em relação ao ambiente em que vivem, esses animais são bons bioindicadores, adequados em fornecer informações sobre as condições dos ambientes em que vivem (Ankley; Johnson, 2004; Kloas; Lutz, 2006; Hoover *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2018; Calderon *et al.*, 2022).

Os anfíbios pertencem ao grupo de vertebrados e esta é subdividida em três ordens: a anura, a caudata, e a gymnophiona (apoda) (Frost, 2011). A Ordem Anura, localizada no quarto nível da pirâmide taxonômica da Figura 4, onde estão inseridos os sapos, as rãs e as pererecas, é caracterizada pela ausência de cauda e por apresentar membros posteriores alongados, que os auxiliam na locomoção por saltos. Na Ordem Gymnophiona, conhecidos como cobras-cegas ou cecílias, estão os anfíbios de corpo alongado, com muitos anéis corporais e ausência de membros. Já na Ordem Caudata, temos os anfíbios com quatro membros e cauda longa (as salamandras e os tritões) (Jenkins *et al.*, 2013; AmphibiaWeb, 2024; Frost, 2024; Segalla *et al.*, 2024). Os anfíbios da ordem anura têm um ciclo de vida em que estágios como a fase larval, são necessariamente aquáticos, tornando-os susceptíveis aos contaminantes presentes nos corpos hídricos (Duellman; Trueb, 1986; Kloas; Lutz, 2006; Verdade *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2015; Marcantonio *et al.*, 2022; Murthy *et al.*, 2022).

Figura 4 - Pirâmide taxonômica indicando a localização da Ordem Anura e posição da espécie *Aquarana catesbeiana*.



Fonte: Autora

Dentre os vertebrados ectotérmicos, os anfíbios anuros integram um grupo diversificado no que se refere à morfologia, fisiologia e comportamento, além de serem encontrados em diferentes habitats (Wells, 2007). Por serem animais que apresentam baixa mobilidade, girinos se locomovem basicamente pela natação tanto para obtenção de alimento quanto para a fuga contra a predação, são vulneráveis à presença de diversos contaminantes ambientais. Além disso, a metamorfose no final da fase larval envolve transformações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais que preparam o animal para a vida terrestre (Denver, 2013; Wake; Koo, 2018). Um animal debilitado, pela presença de contaminantes no meio aquático na fase larval, poderá apresentar alterações no processo de metamorfose para a vida terrestre.

A rã-touro, *A. catesbeiana* (Figura 5) encontra-se distribuída pelo território brasileiro, tanto em produções comerciais de ranicultura, ou na natureza. Em relação ao ponto de vista experimental, é de fácil manutenção em cativeiro e para a experimentação animal (França-Salgueiro, 2013; Londero *et al.*, 2019). Diante disso, girino de rã-touro é um modelo adequado para pesquisas em ecotoxicologia no que se refere ao grupo dos anfíbios, para os quais os

estudos ainda são poucos, é evidente que houve um aumento da utilização de anfíbios como bioindicadores mas se comparados com outros organismos, ainda é possível notar uma defasagem, de 2020 para 2025 encontra-se uma média de 35 artigos publicados por ano utilizando anfíbios (Hayes *et al.*, 2010; PubMed, 2025).

Figura 5 - Girino de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* no estágio 25 de Gosner



Fonte: Autora

Além do exposto, outra motivação do estudo está no declínio populacional de anfíbios, que tem ocorrido ao longo dos anos e pode ser explicado por diversos fatores como: a modificação e divisão do habitat natural com outras espécies (Melstad, Shaffer, 2015; Rocha *et al.*, 2020), elevação da radiação UVB na terra (Franco-Belussi *et al.*, 2018; Londero *et al.*, 2019; Lundsgaard *et al.*, 2020), aquecimento global (Brum *et al.* 2013), as recorrentes contaminações no meio ambiente, com diversos tipos de xenobióticos inseridos no meio ambiente pela ação antrópica (Veronez *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2019; Meter *et al.*, 2019), além

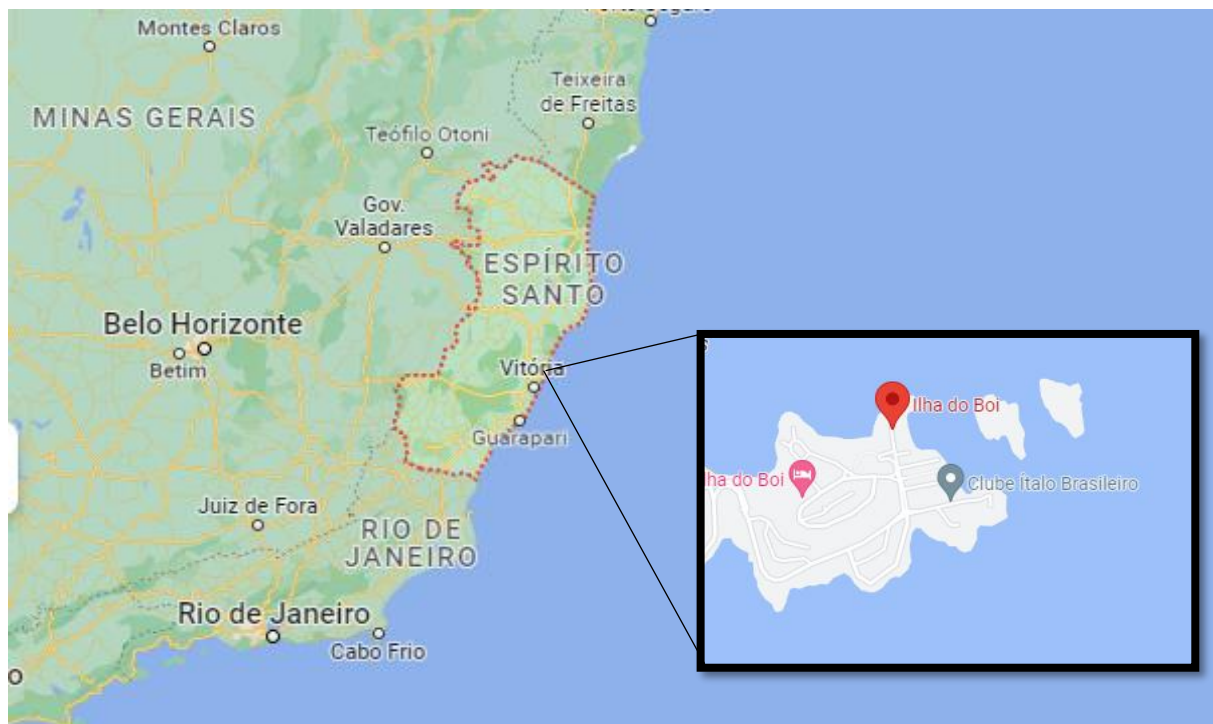
da predação, superexploração e mortalidade de indivíduos por doenças (Hayes *et al.*, 2010). Sendo considerado o grupo, dentro dos vertebrados, mais ameaçado (Cordier *et al.*, 2020).

4. Materiais e Métodos

4.1. Obtenção de amostras de material particulado atmosférico (MPA)

O MPA (o pó preto), foi coletado na Ilha do Boi (20°17'03.8''S, 40°14'24.9''W) (Figura 6), Vitória, ES (onde há ação direta do MPA emitida pelo Complexo de Tubarão), com o auxílio da Organização Não Governamental Juntos SOS Ambiental e levado ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, *campus* São Carlos. As amostras de MPA foram coletadas a 20 m do solo em 30 dias consecutivos. Posteriormente, as amostras foram separadas em 8 frações (425-250 µm) a saber: 250-150 µm, 150-75 µm, 75-45 µm, 45-32 µm, 32-22 µm, 22-10 µm e ≤10 µm (definido como MP₁₀) (ANEXO 1).

Figura 6 - Localização da Ilha do Boi no município de Vitória, estado do Espírito Santo (ES), Brasil (20°18'32"S, 40°16'33"O).



Fonte – Google Maps

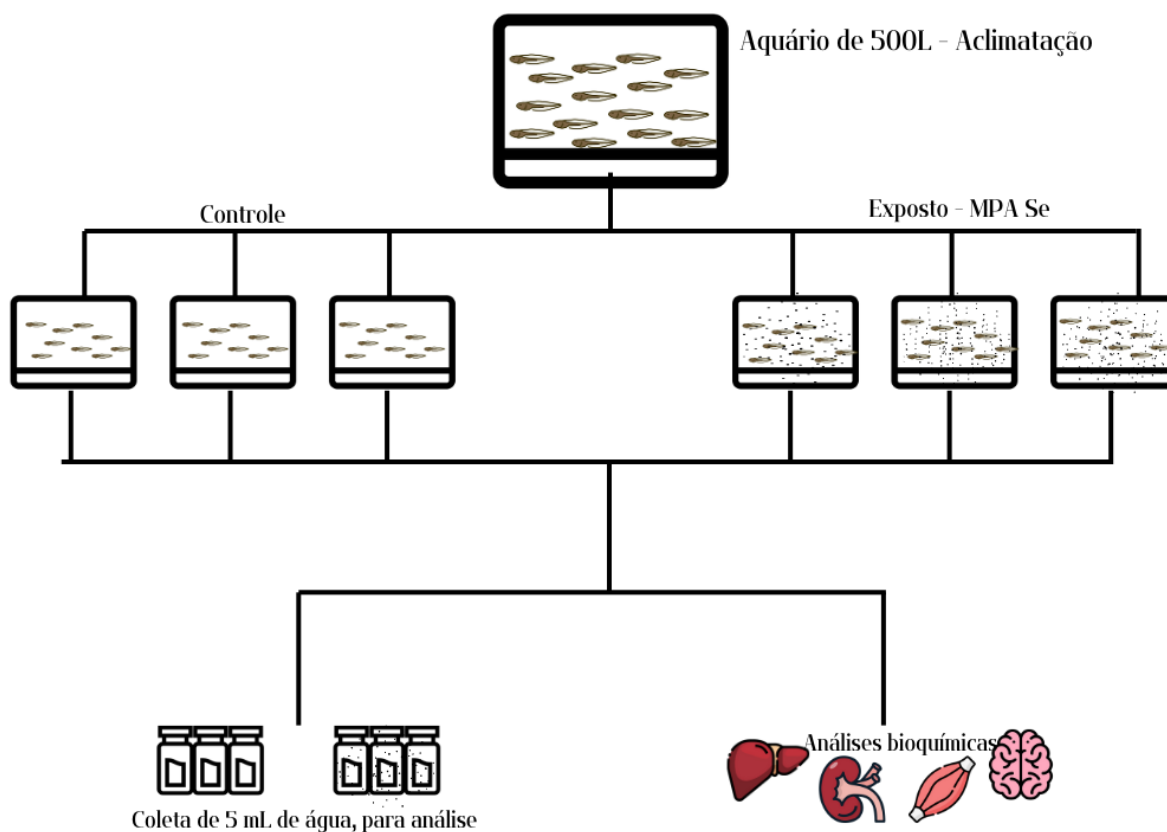
4.2. Coleta e manutenção dos animais em Laboratório

Girinos de rã-touro, *A. catesbeiana*, foram obtidos do ranário RANAMAT, localizado no município de Matão-SP (21°39'03,18''S, 48°23'12,61''O). Os animais foram acondicionados

em sacos plásticos com capacidade de 80 L e imediatamente transportados para o laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (DCF) do *Campus* de São Carlos da UFSCar.

Os animais (N=120) foram mantidos em tanques com capacidade de 500 L para aclimação, no período de 7 dias e atingir o estágio 25 de Gosner, com temperatura e alimentação controladas, até o início da exposição. Os testes compreenderam dois grupos, controle e exposto ao MPA-Se (1 mg L^{-1} , 96h) mantidos em aquários de 200 L de água declorada, contendo 50 animais por aquário (Figura 7). Os aquários foram mantidos em temperatura controlada ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), aeração constante ($> 6 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), fotoperíodo natural (de aproximadamente 12h luz;12h escuro) e protegidos de distúrbios externos. Os experimentos (controle e expostos) foram realizados em sistema estático durante 96h e em triplicata. A alimentação foi interrompida 48h antes do início do experimento.

Figura 7 – Esquema de aclimação e exposição dos girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se), no período de 96h.



Fonte: Autora

Completo o período de exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína por imersão 0,01%, em seguida foram descerebrados para coleta dos órgãos para as análises de MPA, e para análises bioquímicas, neste caso os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela American Society for Testing and Materials - ASTM (2000), e aprovada pela CEUA nº 4046210222 em 07/03/2022 (ANEXO 2).

4.3. Análise do material particulado atmosférico (MPA)

A identificação e quantificação química dos elementos B, Al, V, Cr, Mn, Fe⁵⁶, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Ag, Cd, Sn, Ba, La, Se, Ta, W, Hg²⁰¹, Pb, Bi foram verificadas em cada fração do MPA. As análises foram feitas em triplicata. A identificação dos elementos foi feita utilizando espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina). O controle de qualidade foi efetuado utilizando material de referência certificado e amostras preparadas com a adição de quantidade conhecida do analito a ser medido na matriz (“*spiked sample*”).

4.4. Análise do material particulado sedimentável (MPA-Se) na água

Cerca de 5 mL de água foram coletadas, tanto do aquário do grupo controle como do grupo experimental, e acidificadas com ácido nítrico P.A. na razão de 2% do volume total. Em seguida, foram filtradas em filtros de nitrocelulose 0,45 µm, transferidas para criotubos e acondicionadas a 4 °C até o momento da análise em ICP-MS. O N amostral para esta análise foi 3 para cada amostra de água.

4.5. Análise do material particulado sedimentável (MPA-Se) nos tecidos

Os tecidos foram pesados, liofilizados e triturados individualmente, transferidos para os frascos específicos onde foram acrescidos 250 µL de peróxido de hidrogênio, 750 µL de ácido clorídrico destilado e 3 mL de ácido cítrico destilado (P.A.). Após o período de uma hora, foram aquecidos por 30 minutos a 50 °C e em seguida a temperatura foi alterada para 100 °C e os frascos contendo o material permaneceram nesta temperatura por 24h. Após esse período os frascos foram retirados do aquecimento e resfriados por 30 minutos em uma capela, o líquido resfriado foi passado por um filtro, por uma unidade filtradora e transferido para um novo frasco. A amostra obtida foi pesada, e armazenada em temperatura ambiente para análise em ICP-MS.

A leitura do MPA na água e no tecido permitiu calcular o fator de bioconcentração (BC) de cada metal nos tecidos a partir da fórmula: BC = concentração média de metal no tecido, µg

g^{-1} /concentração média do metal na água de exposição, $\mu\text{g L}^{-1}$. O N amostral para esta análise foi 3 para cada amostra de tecido.

4.6. Análises Bioquímicas

4.6.1. Homogeneização

A homogeneização do fígado, músculo, rim e cérebro foi realizada individualmente com tampão PBS (tampão de fosfato salina, contendo 1,365 M de NaCl, 0,027 M de KCl, 0,054 M de Na_2HPO_4 (7 H_2O) e 0,018M de KH_2PO_4), pH 7,2, com o auxílio do homogeneizador ultraturrax IKA 10®. As amostras foram homogeneizadas em 1,0 mL de tampão de homogeneização com aproximadamente 0,30 a 0,60 mg de amostra de tecido. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 12000g por 20 minutos a 4 °C, e após o sobrenadante foi separado em alíquotas (em tubos ou placas) e as amostras foram congeladas a -80 °C para as diferentes análises bioquímicas. As amostras biológicas foram conservadas em gelo e/ou mantidas sobre superfície gelada para evitar a degradação do material analisado no decorrer das análises bioquímicas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.6.2. Quantificação de Proteínas

A concentração de proteína foi avaliada pelo método de Bradford (1976). A albumina sérica bovina foi utilizada como padrão proteico e os resultados foram expressos como mg de proteína por mL de acordo com a equação obtida pela curva a 595 nm. Alíquotas de 10 μL de cada amostra foram adicionadas nas na microplaca e em seguida cada poço recebeu 250 μL de reativo Bradford. Para o branco 10 μL do tampão PBS foi adicionado a microplaca contendo 250 μL de reativo de Bradford.

Para o cálculo da concentração de proteínas, foi realizada a média das absorbâncias, excluindo o branco e a equação da curva padrão obtida foi utilizada para calcular a concentração de proteína de cada amostra.

4.6.3. Biomarcadores de estresse oxidativo

4.6.3.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método descrito por McCord e Fridovich (1969). Alíquotas de homogenizados de tecidos foram adicionadas ao meio de reação contendo, Xantina 5 mM, cianeto de potássio (KCN) 0,2 mM, citocromo C 100 mM, xantina oxidase (XOD 50U) em tampão fosfato de potássio a 0,1M, pH 7,8. A variação da absorbância (Δ) foi lida a 550 nm durante 6 minutos em intervalos de 15 segundos. O cálculo da SOD se baseia na taxa de inibição da mesma sobre a redução do citocromo C [$100 - ((\Delta\text{Abs amostra} \times 100) / \Delta\text{Abs de referência})$], utilizando a taxa de inibição para obter a unidade de SOD (% de inibição/50) e então a atividade

específica [unidade SOD/volume de amostra x concentração de proteína], tendo seu resultado expresso por U mg de pt⁻¹.

4.6.3.2. Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada pelo método descrito por Aebi (1984). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionadas ao meio de reação contendo tampão cloridrato de tri(hidroximetil)aminometano (TRIS-HCl) 1M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM e peróxido de hidrogênio 30 mM. A absorbância foi lida no tempo total de 2 minutos em intervalos de 15 segundos, em cubeta de quartzo no comprimento de onda de 240 nm. O resultado foi obtido por correção do volume e expresso em nmol H₂O₂ degradado min⁻¹ mg de pt⁻¹.

4.6.3.3 Atividade da glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada pelo método descrito por Flohé e Gunzler (1984). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação contendo Azida sódica 2 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 2 mM, 600 U de glutathione reductase (GR) e peróxido de hidrogênio 0,5 mM em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. A atividade foi verificada a 340 nm por 9 minutos com intervalos de 25 segundos. O cálculo da atividade da GPx foi a partir da média das absorbâncias retirando o branco, dividido pelo coeficiente de extinção (ϵ) do NADH (6,22 mM⁻¹ cm⁻¹), o resultado expresso por nmol min⁻¹ mg pt⁻¹.

4.6.3.4. Atividade da glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada seguindo o descrito por Keen (1976). Para o ensaio alíquotas de homogenados de tecidos foram pipetados no meio de reação contendo GSH 1,5 mM, 2,4-Dinitroclorobenzeno (CDNB) 2 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5. A absorbância foi lida em 340 nm por 10 minutos em intervalos de 45 segundos. Para o cálculo da atividade de GST foram utilizadas as médias sem o branco, dividido pelo ϵ do CDBN (9,6), dividido pela concentração de proteínas, tendo seu resultado expresso por nmol min⁻¹ mg pt⁻¹.

4.6.3.5. Quantificação de Lipoperoxidação (LPO)

A concentração de LPO foi avaliada pelo método de oxidação do ferro por alaranjado de xilenol (FOX) de acordo com Jiang (1991). As alíquotas do homogenado de tecido foram acrescidas de TCA 10% na concentração 1:1, mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos a 5000g. Em seguida, foram adicionados ao sobrenadante 800 μ L do meio de reação contendo 47,37 mL de metanol P.A., 1 mL da solução de laranja de xilenol dissódico 100 μ M (dissolvido em 1 mL de metanol), 125 μ L de H₂SO₄ 25 mM, 1 mL da solução de hidroxitolueno butilado (BHT) 4 mM (dissolvido em 1 mL de metanol P.A.) e

0,5 mL da solução de sulfato ferroso amoniacal ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$) 250 μM (dissolvido em 0,5 mL H_2O destilada). Para o branco foram utilizados 200 μL de PBS pH 7,2 e 800 μL de meio de reação.

Os tubos contendo as amostras foram mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos e agitados por inversão em intervalos de 3 minutos, centrifugados a 9000g por 10 minutos. Alíquotas de 200 μL do sobrenadante foram transferidas para a microplaca e as absorbâncias lidas a 570 nm. Para a obtenção da concentração de LPO foi calculada a média das leituras, excluído o branco. A concentração de LPO foi expressa em nmoles por mg de proteína por mL utilizando-se o coeficiente de extinção do BHT de 2,325.

4.6.3.6. Quantificação de Proteínas Carbonilas (PC)

A concentração de PC foi determinada de acordo com o método descrito por Levine (1994). Nas alíquotas de 200 μL de homogeneizado foram adicionados 500 μL do meio de reação, que continha 2,4-Dinitrofenil Hidrazina (DNPH) 10 mM em 28 mL de HCl 2 M. Para o branco foram utilizados 200 μL de PBS pH 7,2 e 500 μL de HCl 2 M. Os tubos permaneceram incubados em banho-maria por 90 minutos na temperatura de 30 a 37 °C, depois de retirados permaneceram em gelo. A essas alíquotas foram adicionados 700 μL de ácido tricloroacético (TCA) 28%, agitadas e centrifugadas a 9000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de solução etanol-acetato de etila, na concentração de 1:1. Essa solução foi misturada e centrifugada a 9000g por 10 minutos. Esses procedimentos foram repetidos de duas a três vezes até que o sobrenadante estivesse transparente. O precipitado foi ressuspense em 500 μL de solução de hidrocloreto de guanidina 6 M. Essa solução foi misturada e centrifugada a 9000g por 3 minutos.

Alíquotas de 200 μL do sobrenadante foram transferidos para a microplaca e a absorbância foi determinada em 370 nm. Para a obtenção da concentração de PC, foi realizada a média das absorbâncias e excluído o branco. A concentração de PC foi expressa em nmoles de carbonilas por mg de proteína por mL utilizando-se o coeficiente de extinção de 22.000 do DNPH.

4.6.3.7. Quantificação de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração de TBARS foi determinada de acordo com método descrito por Federici *et al.* (2007). Alíquotas de homogenizados de tecidos foram colocadas nas microplacas contendo BHT 0,01% em tampão PBS pH 7,2. Em seguida, foi adicionado, TCA 50% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3%. A microplaca foi mantida a 40 °C por 80 minutos seguida de dois ciclos de baixa agitação por 5 minutos. As absorbâncias foram lidas a 535 nm. Para o branco foi adicionado 30 μL de água destilada no lugar da amostra.

Para o cálculo da concentração de TBARS foram determinadas as médias das absorbâncias, excluindo o branco. A curva padrão do malondialdeído (MDA) foi usada para determinar a concentração de TBARS, os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína.

4.6.3.8. Quantificação de Metalotioneína (MT)

A concentração de MT foi determinada de acordo com o método descrito por Viarengo (1997). A glutathiona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão de conteúdo de grupamentos sulfidrilas (-SH) de acordo com a equação obtida pela curva determinada a 412 nm. Alíquotas de 200 µL do homogeneizado foram transferidos para os tubos *ependorf* e adicionados a elas 228 µL da *solução 1*, a qual continha 18,6 mL de etanol absoluto e 1,4 mL de clorofórmio e centrifugadas por 10 minutos a 6000g. Para o branco foi utilizado 200 µL de PBS e 228 µL da *solução 1*. Após essa centrifugação, foram transferidos 327 µL do sobrenadante para um novo tubo e adicionado 1002 µL da *solução 2*, que continha 78,26 mL de etanol absoluto e 1,74 mL de HCl concentrado (~37%), sob agitação e centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 667 µL da *solução 3* que continha 47,85 mL de etanol absoluto, 0,55 mL de clorofórmio e 6,6 ml de tampão Tris-HCl a 20 mM pH 8,6. O precipitado ressuspensionado nesta solução foi agitado e centrifugado (10 minutos a 6000g). Ao fim dessa etapa, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 34 µL de solução NaCl 250 mM e 34 µL de solução EDTA-sódico 4 mM, agitado e adicionado 667 µL de solução de Ellman (contendo tampão Fosfato de Sódio 0,2 M e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5 mM) (ELLMAN, 1961; ARAÚJO *et al.*, 2016) novamente agitado e centrifugado a 3000g por 5 minutos. Em seguida 200 µL desse sobrenadante foram utilizados para determinação da MT a um comprimento de onda 412 nm. Para o branco, foram utilizados 200 µL de solução de NaCl 250 mM e de solução EDTA-sódico 4mM (1:1). Para o cálculo da concentração da MT foram determinadas as médias das absorbâncias, excluindo o branco. A curva padrão da GSH foi usada para determinar o conteúdo de -SH. A partir do conteúdo de -SH foi estimado o conteúdo de MT, com o resultado expresso por µg de SH por mg de proteína.

4.6.3.9. Atividade da Óxido Nítrico Sintase (NOS)

A atividade da enzima óxido nítrico sintase total (tNOS) foi determinada de acordo com o kit E-ELH0753 (Elabscience®, Calbiochem-Novabiochem Corporation, EUA), seguindo a metodologia do fabricante. O princípio deste ensaio baseia-se na medição do dióxido de nitrogênio (NO₂) produzido na amostra usando Reagente de Griess a 450 nm. A atividade NOS foi determinada a partir de uma curva padrão e expresso como pg/mL.

4.6.4. Biomarcador de neurotoxicidade

4.6.4.1. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada seguindo o método descrito por Ellman (1961). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação contendo DTNB 0,75 mM e iodeto de acetilcolina 9 mM. A leitura de absorbância foi a 405 nm por 8 minutos em intervalos de 45 segundos. O cálculo da concentração da atividade de acetilcolina foi feito a partir da variação da absorbância dividido pelo coeficiente de extinção (ϵ) do 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina (13,6) e dividido pela concentração de proteína. A atividade expressa em $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ pt}^{-1}$.

4.6.5. Biomarcadores metabólicos

4.6.5.1. Atividade da Hexoquinase (HK)

A atividade da HK foi determinada de acordo com o descrito por Ueyda e Racker (1965). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 contendo MgCl_2 7,5 mM, 0,3 UI Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), glicose 25 mM, NADP^+ 0,55 mM e ATP 36 mM em volume total de 200 μL . A reação foi iniciada com adição do NADP^+ e a absorbância foi lida em 340 nm por 10 minutos em intervalos de 20 segundos.

4.6.5.2 Atividade da Fosfofrutoquinase (PFK)

A atividade da PFK foi determinada seguindo o descrito por Layzer *et al.* (1969). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação Tris-HCl 100 mM, pH 8,2 contendo MgCl_2 5 mM, Frutose 6-fosfato (F6P) 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 mM, $\text{NADH}+\text{H}^+$ 0,15 mM, 100 UI de aldolase e 1002 UI de glicerofosfato desidrogenase e triose fosfato isomerase (GDH-TPI) e ATP 1 mM em volume total de 200 μL . A absorbância foi lida em 340 nm por 10 minutos em intervalos de 20 segundos.

4.6.5.3 Atividade da Piruvatoquinase (PK)

A concentração da PK foi determinada seguindo o descrito por Bucher e Pfeleiderer (1955). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 contendo Fosfoenolpiruvato (PEP) 1 mM, MgCl_2 8 mM, KCl 70 mM, $\text{NADH}+\text{H}^+$ 0,1mM, 3 UI LDH e ADP 1 mM em volume total de 200 μL . A absorbância foi lida em 340 nm por 10 minutos em intervalos de 20 segundos.

4.6.5.4 Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi determinada como descrito por Bergmeyer (1974). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação, tampão fosfato de potássio

100 mM, pH7,4 contendo NADH+H⁺ 0,14 mM e piruvato 1 mM em volume total de 200 µL. A absorbância foi lida em 340 nm por 10 minutos em intervalos de 20 segundos.

4.6.5.5 Atividade da Malato Desidrogenase (MDH)

A atividade da MDH foi determinada como descrito por Childress e Somero (1979). Alíquotas de homogenados de tecidos foram adicionados ao meio de reação Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo MgCl₂ 20 mM e NADH+H⁺ 0,14 mM e oxalacetato 0,4 mM em volume total de 200 µL. A absorbância foi lida em 340 nm por 10 minutos em intervalos de 20 segundos.

O cálculo da atividade das enzimas, HK, PFK, PK, LDH e MDH foi feito a partir da variação da absorbância, dividido pelo coeficiente de extinção (ϵ) do NADH (6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) e dividido pela concentração de proteínas, sendo o resultado expresso por U/mg pt⁻¹.

4.6.5.6 Quantificação de Glicose

A concentração de glicose foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 133, pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase a 505 nm de acordo com a orientação do fabricante com algumas modificações. O cálculo da concentração foi feito a partir de uma curva padrão e a concentração de glicose foi expressa como mg dL⁻¹.

4.6.5.7 Quantificação de Triglicérides

A concentração de triglicérides foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 87, pelo método enzimático colorimétrico da glicerol-3-fosfato-oxidase a 505 nm de acordo com a orientação do fabricante com algumas modificações. O cálculo da concentração foi feito a partir de uma curva padrão e a concentração de glicose foi expressa como mg dL⁻¹.

4.6.5.8 Atividade da Alanina aminotransferase (ALT)

A atividade da ALT foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 1008. Para a determinação da ALT o método utilizado se baseia na transferência do grupo L-alanina para o cetoglutarato pela enzima com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato (pela ação da lactato desidrogenase) e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) que é oxidada a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) sendo diretamente proporcional a atividade de ALT na amostra. Desta forma, pipetou-se 152 µL da mistura da solução Reagente 1 (Tris/L-alanina/LDH/azida sódica) + Reagente 3 (Tris/piridoxal fosfato/azida sódica) e 20 µL de amostra, seguida de incubação por 5 minutos a 25 °C. Posteriormente, adicionou-se 38 µL da solução de Reagente 2 (Tris/NADH/ α -cetoglutarato/azida sódica), incubou-se a 25 °C por 1 minuto e efetuou-se a leitura da absorbância a 340 nm nos intervalos de 2 minutos.

4.6.5.9 Atividade da Aspartato aminotransferase (AST)

A atividade da AST foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 109. Para a determinação da AST, o método utilizado se baseia na catálise desta enzima pela transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com a formação de glutamato oxalacetato. Este é reduzido a malato (pela ação da malato desidrogenase) com oxidação da coenzima NADH a NAD^+ sendo diretamente proporcional a atividade de AST na amostra. Desta forma, pipetou-se 152 μL da mistura da solução Reagente 1 (Tris/L-aspartato/MDH/LDH/azida sódica) + Reagente 3 (Tris/piridoxal fosfato/azida sódica) e 20 μL de amostra, seguida de incubação por 5 minutos a 25 °C. Posteriormente, adicionou-se 38 μL da solução de Reagente 2 (Tris/NADH/ α -cetoglutarato/azida sódica), incubou-se a 25 °C por 1 minuto e efetuou-se a leitura da absorbância a 340 nm nos intervalos de 2 minutos.

4.6.5.10 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade da ALT foi determinada de acordo com o kit da Labtest Ref. 79. Para a determinação da ALP o método utilizado se baseia na hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela enzima liberando o p-nitrofenol que é diretamente proporcional a atividade enzimática da ALP na amostra. Pipetou-se 200 μL da mistura da solução Reagente 1 (HEDTA/sulfato de zinco/acetato de magnésio/azida sódica) e Reagente 2 (p-Nitrofenilfosfato/fenol) e 10 μL de amostra, seguida de incubação por 1 minuto a 25 °C. Posteriormente, realizou-se a leitura em 405 nm e a absorbância foi registrada em intervalos de 2 minutos.

4.7 Procedimentos estatísticos

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

5. Resultados

Os resultados serão apresentados em capítulos, em forma de artigo científico.

O capítulo I - Oxidative stress and neurotoxicity induced by atmospheric settleable particulate matter exposure on bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802), trata sobre os efeitos neurotóxicos e de estresse oxidativo nos órgãos de girinos de rã-touro sob o efeito do MPASe. O artigo foi publicado pela revista *Chemosphere*. Dessa forma, o capítulo está apresentado como uma cópia ao que foi publicado.

O capítulo II - Exposição ao material particulado atmosférico sedimentável: efeitos no metabolismo de girinos de rãs-touro, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802). Se refere aos resultados obtidos em relação ao metabolismo dos girinos de rã-touro e os efeitos causados pela exposição do MPA-Se.

Capítulo I

Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, (Shaw, 1802)

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141576>

Isabela Ferreira Fernandes¹, Gabriel Hiroshi Fujiwara¹, Heidi Samantha Moraes Utsunomiya², Iara Costa Souza^{3,4}, Diana Amaral Monteiro³, Magdalena Victoria Monferrán^{5,6}, Daniel Alberto Wunderlin⁶, Marisa Narciso Fernandes³, Cleoni dos Santos Carvalho^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, Rodovia João Leme Dos Santos, Km 110, SP-264, Sorocaba, SP CEP 18052-780, Brazil

² Departamento de Biologia (DBio), Centro de Ciências Humanas e Biológicas (CCHB), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 18052-780, São Carlos, São Paulo, Brazil.

³ Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

⁴ Grupo de Mutagênese Ambiental, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (DBV/UFES), Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

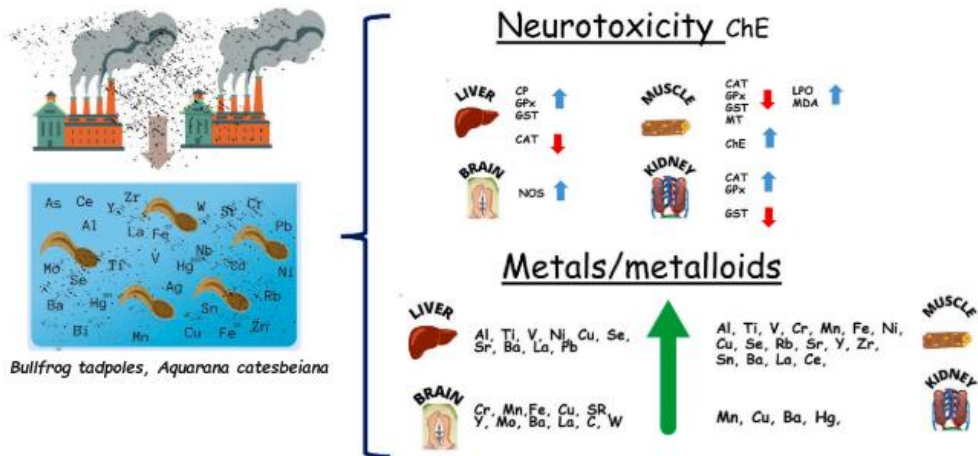
⁵ Departamento Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, and CONICET, CIBICI, Ciudad Universitaria, Medina Allende esq. Haya de la Torre s/n, 5000, Córdoba, Argentina.

⁶ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC), CONICET and Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000, Córdoba, Argentina.

* Corresponding author. E-mail addresses: san-cleo@ufscar.br (C.S. Carvalho).

GRAPHICAL ABSTRACT

Oxidative stress LPO, MDA, MT, CP, CAT, GPx, GST and NOS



Abstract: Bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, were exposed to settleable particulate matter (SePM), (1 g L^{-1} , 96 h) and their organs were collected for analysis of metal/metalloid, oxidative stress and neurotoxicity in liver, muscle, kidney and brain. The SePM water of the exposed groups contained 18 of the 28 metals/metalloids detected in ambient particulate matter (APM). Fe56 and Al were those that presented the highest concentrations, Cr, Mn, Pb and Cu increased from 10 to 20 times and Ti, V, Sr, Rb, Cd, Sn and Ni increased from 1 to 3 times compared to the control. Bioaccumulation of metals/metalloids in the exposure water varied significantly between organs, with the muscle and liver showing the highest concentrations of metals, followed by the brain. Lipoperoxidation and malondialdehyde increased only in muscle, while carbonyl proteins increased only in the liver and brain. Regarding nitric oxide synthase, there was an increase in the liver and brain in the group exposed to SePM. Catalase activity decreased in the liver and muscle, while the activity of glutathione peroxidase, increased in the liver and kidney and decreased in muscle. Glutathione S-transferase, which is mainly responsible for detoxification, increased in the liver and decreased in muscle and the kidney. Cholinesterase activity increased only in the muscle. The results indicate oxidative stress, due to oxidation catalyzed by metals, components of SePM. Thus, the results contribute to the understanding that SePM has a deleterious effect on the aquatic environment, negatively affecting bullfrog tadpoles, in different ways and levels in relation to the analyzed organs.

Keywords: bioaccumulation, amphibians, antioxidant responses, metals, enzymes

1. Introduction

Anthropogenic activities such as industrial processes, biomass burning and the increased use of motor vehicles are some of the causes of the increase in atmospheric pollution by atmospheric particulate matter (APM) (Schleicher and Weiss, 2023). APM is responsible for many types of damage to the soil and water, modifying the ecosystem and affecting the organisms that inhabit these areas. These pollutants can cause damage at biological different levels (Bogo *et al.*, 2003; Hartono *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021a; Guo *et al.*, 2022; Schleicher and Weiss, 2023) contributing to the development of human diseases which resonate in economy and public health (Guo *et al.*, 2022; Pryor *et al.*, 2022). APMs are variable in composition and are less than 100 μm in diameter (Hartono *et al.*, 2017). Brazilian studies in aquatic ecosystem highlight the presence of settleable atmospheric particulate matter (SePM), such as those conducted by Santos *et al.* (2017) and Souza *et al.* (2018, 2019, 2021a,b). We highlight the study of Souza *et al.* (2021b) who identified in samples from the aquatic environment, close to the steel industry, APM with a high concentration of hematite containing Fe, Al, Mn and Ti, in addition to emerging metallic pollutants such as Y, Zr, Sn, La, Ba and Bi. The same study shows that APM can dissociate in water and form nanoparticles (NPs) smaller than 200 nm, which can contribute to increased water contamination leading to bioaccumulation and biomagnification of these elements in aquatic organisms. Adorno *et al.* (2023), verified the presence of metals (Pb, Zn, Cu, V, Cr, Ni, Y, W and Ag) besides the presence of the emerging contaminants (Ti, Y, La, Ce and W) in the water of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed for 96 h to 1 g L^{-1} of SePM. A review study on APMs and metals developed by Popoola *et al.* (2018) highlights the need for a comparative analysis of atmospheric metal concentrations in the environment, as well as assessment, monitoring and control of these substances in the atmosphere to reduce their inhalable effects on health. Studies have shown the effects of exposure to APMs on human health, with damage to the respiratory system (Lakey *et al.*, 2016; Hadei and Naddafi, 2020; Pryor *et al.*, 2022). However, studies that focused on oxidative stress biomarkers in aquatic organisms in response to particulate material are still scarce (Duan *et al.*, 2017; Hartono *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2022; Adorno *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2023). The excess in the formation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (NOS) leads to an imbalance between oxidants and antioxidants, causing oxidative stress (Pisoschi and Pop, 2015). The failure of the antioxidant defence system can lead to the oxidation of biological molecules, increasing oxidative damage to cells and cellular tissues (Van Der Oost *et al.*, 2003; Veronez *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2020). Regarding amphibians, there is little knowledge

about the biology of tropical or subtropical amphibian species, in addition to restricting the use of these animals in toxicological studies, as some are at risk of extinction. On the other hand, *Aquarana catesbeiana* (syn. *Lithobates catesbeianus*) is an amphibian species with a well-known biology, with a high adaptive capacity and it is easy to be obtained for laboratory tests. The tadpoles of this species present an ideal size; thus, this species represents a good model for ecotoxicological studies in relation to the group of amphibians that are little studied (Hayes *et al.*, 2010; Ossana *et al.*, 2013; Paetow *et al.*, 2013; Veronez *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2021; Utsunomiya *et al.*, 2022). Given the lack of research on the effects of SePM on amphibian's health, the aim of this study was to assess how acute exposure to 1 g L^{-1} SePM affects bullfrog tadpole's *A. catesbeiana*, at 21–25 Gosner stage, through biochemical biomarkers and to determine the presence and bioaccumulation of metals in different organs. Therefore, this study is relevant because, although the effects of metals of this class have already been demonstrated (Veronez *et al.*, 2016, Prokic *et al.*, 2016a, 2016b; Jayawardena *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2021; Krohn *et al.*, 2021), a study with environmental SePM formed by a mixture of metals with different compositions and properties has not yet been performed in this species and at this stage of development, when these animals spend more time in contact with water.

2. Materials and Methods

2.1. Study area and Settleable atmospheric particulate matter (SePM) collection

The SePM was collected in the Ilha do Boi, city of Vitória, state of Espírito Santo (ES), Brazil Southeast ($20^{\circ}18'32''\text{S}$, $40^{\circ}16'33''\text{O}$) as described by Souza *et al.* (2021a). This region has a metallurgy complex with iron ore pelletizing, iron exportation, steel industry and exporting; In Brazil being recognized as the second iron exportation pole in the world. Studies report that this region has a great influence (approx. 70%) on the SePM emitted by the Tubarão Complex (Santos *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2020; Galvão *et al.*, 2022), with a major influence of the steel industry. In March 2018, the non-governmental organization JUNTOS SOS Ambiental collected aerial samples of SePM every day for 30 days ($\sim 5\text{--}8 \text{ g m}^{-2}$ month). The SePM samples were collected at a height of 20 m above ground level on Ilha do Boi (Vitoria, Brazil) in an area of 5000 m^2 . After collection, samples were sieved and stored in closed containers at room temperature (Souza *et al.*, 2021a). The 30 SePM samples were sieved to remove inert material and other aggregates, fractionated into different sizes and chemically characterised (Souza *et al.*, 2019, 2021b). As the differences between the samples were less than 20%, one sample was selected from the 30 initially obtained and used for the study.

2.2. Experimental setup

2.2.1. Test organism

Bullfrog tadpoles, *A. catesbeiana*, at 21–25 Gosner stage (Gosner, 1960) were obtained from RANAMAT ranch, located in Matao-SP (~21°39'03.18 "S, 48°23'12.61 "W). The animals were packed in plastic bags with 80 L capacity and immediately transported to the Laboratory of Zoophysiology and Comparative Biochemistry (DCF) of the Federal University of Sao ~ Carlos (UFSCar).

The animals (N = 120) were acclimatized for 10 days in 500 L tanks containing tap water dechlorinated with controlled temperature and feeding, until the beginning of the exposure. Acclimated tadpoles were fed daily ad libitum with commercial meal containing 40% crude protein (Alcon ®). In order to avoid the sorption of metals in food and organic matter, the feeding was interrupted for 48 h prior to the exposure to metals.

2.2.2. Experimental protocol

The tests comprised a control group, free of SePM and a group exposed to 1 g L^{-1} , of SePM. This concentration is based on the deposition rates ($\sim 10\text{--}20 \text{ g m}^{-2} 30 \text{ day}^{-1}$) of APM in the Metropolitan Region of Vitoria ´ during the rainy season (Santos et al., 2017; Adorno *et al.*, 2023), and represents a deposition rate of $\sim 18 \text{ g m}^{-2} 30 \text{ day}^{-1}$. It is considered environmentally relevant. The experiments were conducted in 200 L aquaria containing 20 animals per aquarium, in a static system for 96 h and performed in triplicate. These animals were used for analysis of metals in tissues (n = 3) and the rest for biochemical determinations.

The tanks were kept at $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, pH (7.0–7.4), constant aeration ($>6.0 \text{ mg O}_2\text{/L}$), hardness (50–59 mg/L, such as CaCO_3), conductivity ($55\text{--}99 \pm 0.02 \text{ mS/cm}$), natural photoperiod (12 h light; 12 h dark) and ammonia ($<1 \text{ mg/L}$) were monitored daily and kept constant and protected from external disturbances. The physical and chemical parameters of the test solution, measured at the beginning and at the end (96 h) of the assay were similar at the beginning and at the end of the assay and the tank temperature, was regularly observed throughout the exposure period. After the exposure period was completed, the animals were euthanized with 0.01% benzocaine, then decerebrated to collect organs for SePM and biochemical analysis, in this case, the organs were frozen in liquid nitrogen and kept at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. (

2.2.3. Water and tissue samples collected for SePM determination

Water samples were collected from the control and SePM-exposed groups after exposure of the animals. Samples were acidified with 2% nitric acid (sub-boiling grade). Soft tissues were used (n = 3 animals per control and SePM exposure) to determine metal/metalloid concentrations in tadpole organs after acid digestion (Berghof speedwave XPERT, Germany). Measurements were performed in triplicate. Sub-boiling, hydrochloric acid (37%) and nitric acid (69%) were added to dried and individually ground samples with 30% hydrogen peroxide and heated in Teflon digestion units at 100 °C for 24 h. The digested solution was filtered with 0.45 µm nitrocellulose filters according to Agilent ICPMS guidelines for determination of dissolved elements. These digested samples were stored at 4 °C until they were analyzed.

2.2.4. Metal analyses using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)

The acidified and digested samples (water and tissues) were used to determine the concentrations of 28 metals/metalloids (Ag, Al, As, Au, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe₅₆, Hg₂₀₂, La, Mn, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Se, Sn, Sr, Ti, V, W, Y, Zn and Zr) in triplicate (Brockhoff *et al.*, 1994). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7500cx, USA) was used to assess the presence of metals and metalloids in the sample individually (previously digested) according to Souza *et al.* (2019). Certified material (MR-Agro E3002A, July 2020) was used for quality control and metal values and measurement accuracy were around $\geq 97\%$. The tables and figures show the detection and quantification limits of the reference materials.

The bioconcentration factor (BCF) for metals in tissues was calculated using the formula: $BCF = \text{mean concentration of metal in tissue, } \mu\text{g g}^{-1} / \text{mean concentration of metal in water, } \mu\text{g L}^{-1}$. The sample N was 3 for both organs and water. 2.2.5. Biochemical analysis

Homogenization of the liver, kidney, muscle and brain was performed individually using a PBS buffer (phosphate buffered saline, containing 1.365 M NaCl, 0.027 M KCl, 0.054 M Na₂HPO₄ (7H₂O) and 0.018 M KH₂PO₄), pH 7.2, using an IKA 10® ultraturrax homogenizer. The samples were homogenized in 1 mL of homogenization buffer with approximately 0.30–0.60 mg of tissue sample. Subsequently, the homogenate was centrifuged (HERMLE Z 323 K) at 12.000 g for 20 min at 4 °C (Wilson and Walker, 2018), and afterward, the supernatant was separated in aliquots (in tubes or plates) for the different biochemical analyses. The samples were stored at – 80 °C.

During the biochemical determinations, the samples were kept in ice and/or prepared on an iced surface to minimize the degradation of the analyzed material. All analyses were performed in triplicate. Biochemical assays were carried out in triplicate on a Synergy HTX microplate reader, except for the CAT that was performed on the Biochrom spectrophotometer at 25 °C.

The protein concentration (pt, mg mL^{-1}) was determined according to the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin as the protein standard at 595 nm. The LPO concentration (nmol of Cumenehydroperoxide – CHP mg^{-1} pt) was determined according to the iron oxidation by xylenol orange (FOX) method described by Jiang *et al.* (1991) at 570 nm using CHP as a standard. Malondialdehyde (MDA, nmol mg^{-1} pt) equivalents were determined by a Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARs) according to the method described by Federici *et al.* (2007) at 532 nm using MDA as a standard. Carbonyl proteins (CP, nmol mg^{-1} pt) were evaluated by the method described by Levine *et al.* (1994), based on the reaction of carbonylated proteins with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and the molar extinction coefficient, $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 370 nm.

The content of metallothionein (MT, nmol SH mg^{-1} pt) was calculated according to the concentration of sulfhydryl groups (SH), using reduced glutathione (GSH) as a standard and Ellman's reagent (DTNB, 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) at 412 nm by Viarengo *et al.* (1997).

SOD activity (U mg^{-1} pt) was determined by 50% inhibition of the rate of reduction of cytochrome c as described by McCord and Fridovich (1969). CAT activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ pt) was calculated from the decomposition of H_2O_2 per minute according to Aebi (1974). GPx activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ pt) was determined using nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and its molar extinction coefficient of 6.22 mM cm^{-1} according to Flohe and Gunzler (1984). GST activity ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ pt) was calculated with GSH as substrate and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and the molar extinction coefficient of $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm according to Keen *et al.* (1976).

Cholinesterase (ChE) activity (pmol mg^{-1} pt) was determined by the method described by Ellman *et al.* (1961) by extinction of 2-nitrobenzoate-5-mercaptothiocholine ($13.6 \times 10^3 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and formation of acetylthiocholine. Total nitric oxide synthase (tNOS) activity (pg mL^{-1}) was determined in the liver and the brain according to kit E-ELH0753 (Elabscience®, Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA), following the manufacturer's methodology at 450 nm from a standard curve.

2.3. Statistical analysis

The data are presented as mean \pm standard deviation (S.D.). Normality of samples and homogeneity of variances were assessed using the Kolmogorov-Smirnov and F tests, respectively. Groups were compared using t-tests (parametric) or Mann-Whitney U-tests (nonparametric) (one-way analysis of variance, ANOVA). Statistical differences were confirmed with P values < 0.05 . SigmaStat 3.5 software for Windows (Copyright © 2006, Systat Software, Inc.) was used for analyses. The correlation tables were created in the Rstudio programme using the {sJPlot} package, and using the Pearson method, the correlation analyzes were carried out. The method was chosen after assessing the normality of the samples, using the Shapiro-Wilk test for the variables. The final tables were constructed on the basis of the correlations between the biomarkers and the metals present in each organ.

2.4. Ethical statement

The Animal Ethics Committee at the Federal University of Sao ~ Carlos (CEUA-UFSCar) approved all the procedures carried out in this study (Protocol#4046210222/2022). All procedures were performed according to the standards established by the American Society for Testing and Materials - ASTM (2000).

3. Results and discussion

Water from the SePM contained 18 of the 28 metals/metalloids detected in the APM (Figure 1A, Supplementary material 1). The chemical composition detected in the water of exposure to SePM revealed elevated concentrations (128.84 at 10.12 $\mu\text{g L}^{-1}$) of the following metals: Fe $>$ Al $>$ Sr $>$ Pb $>$ Cu $>$ Mn; concentrations of 6.92 to 2.03 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the Rb $>$ Cr $>$ Ni $>$ Sn and of 1.61 to 0.06 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the V $>$ Ti $>$ Cd $>$ Ce $>$ La $>$ Y. The highest differences were observed to Fe⁵⁶ (about $128.84 \pm 0.14 \mu\text{g L}^{-1}$), which was not detected in the control water and Al in which levels were 18 times higher than control. The concentrations of Pb, Cu, Mn and Cr measured in the water from the SePM were 14.64, 13.14, 10.12 and 3.81 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively. They were significantly different and about 10 to 20 times higher than in the control water samples. The other metals such as Ni, Sn, V, Sr, Rb, Ti and Cd were detected in SePM water in concentrations of about 2.15 to 1.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (in descending order) but increased about 3.2 times compared to the control. The concentrations of Cd, Cu and Pb were above the limit (1, 9 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) allowed by the Brazilian guidelines (CONAMA resolution 357/2005) and As, Se, Zr, Nb, Mo, Ag, W, Hg²⁰² and Bi were not detected in the water from the SePM and the

control. They were lower than the detection limit (<LOD) in relation to the references used in the ICP-MS. Similar to the studies by Souza *et al.* (2021b), emerging metallic contaminants such as Y, La, Ce and Ba were detected in SePM samples (Figure 1B, Supplementary material 1). An interesting study was carried out by Santos *et al.* (2023), who exposed *Pelophylax perezi* tadpoles to eucalyptus and pine ash for 14 days, and the chemical characterization of these ashes showed higher concentrations of As, Cd, Co, Cr, Pb and V for eucalyptus, while pine showed higher concentrations of Cu, Mn, Ni and Zn. These studies are important because they show diffuse sources of contamination in aquatic ecosystems.

Aquatic organisms can absorb chemical contaminants from their diet or from surface water and this can lead to biomagnification along the food chain (Prokić, *et al.*, 2016a; Singh *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2021a; Noman *et al.*, 2022). This can affect their survival and pose a threat to secondary consumers (Krohn *et al.*, 2021). The muscle and liver were the organs that accumulated more metals followed by the brain. Chemical analysis confirmed the increase (about 1-10 times) of Y, Ba, La, Zr, Ni, V, Pb, Sr, Se, Ti, Cu and Al (in ascending order) in the liver and indicated the absorption of metals by these organisms, while Fe⁵⁶, Zn and Rb decreased about 1 to 2 times after 96h exposure to SePM (Table 1). The liver plays an essential role in metabolism (Carvalho *et al.*, 2017; Romanova *et al.*, 2021), in addition to being able to accumulate metals, distribute them and also promote the detoxification of these elements (Dobrovoljc *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2021); these functions may explain the greater accumulation of metals in this organ. Similar results in the liver were recorded by other researchers with amphibians (Mouchet *et al.*, 2015; Prokić *et al.*, 2016b; Singh *et al.*, 2016; Borković-Mitić *et al.*, 2016). While the study by Provik *et al.* (2016a) showed that skin had higher concentrations of metals (Zn > Fe > Cu > Cr > Pb > Cd) compared to muscle (As > Cu > Cr > Hg) in frogs of the *Pelophylax esculentus* complex inhabiting the Obedska Bara wetland in Serbia, demonstrating that the route of exposure to the pollutant and the functions of the organs affect the uptake of metals.

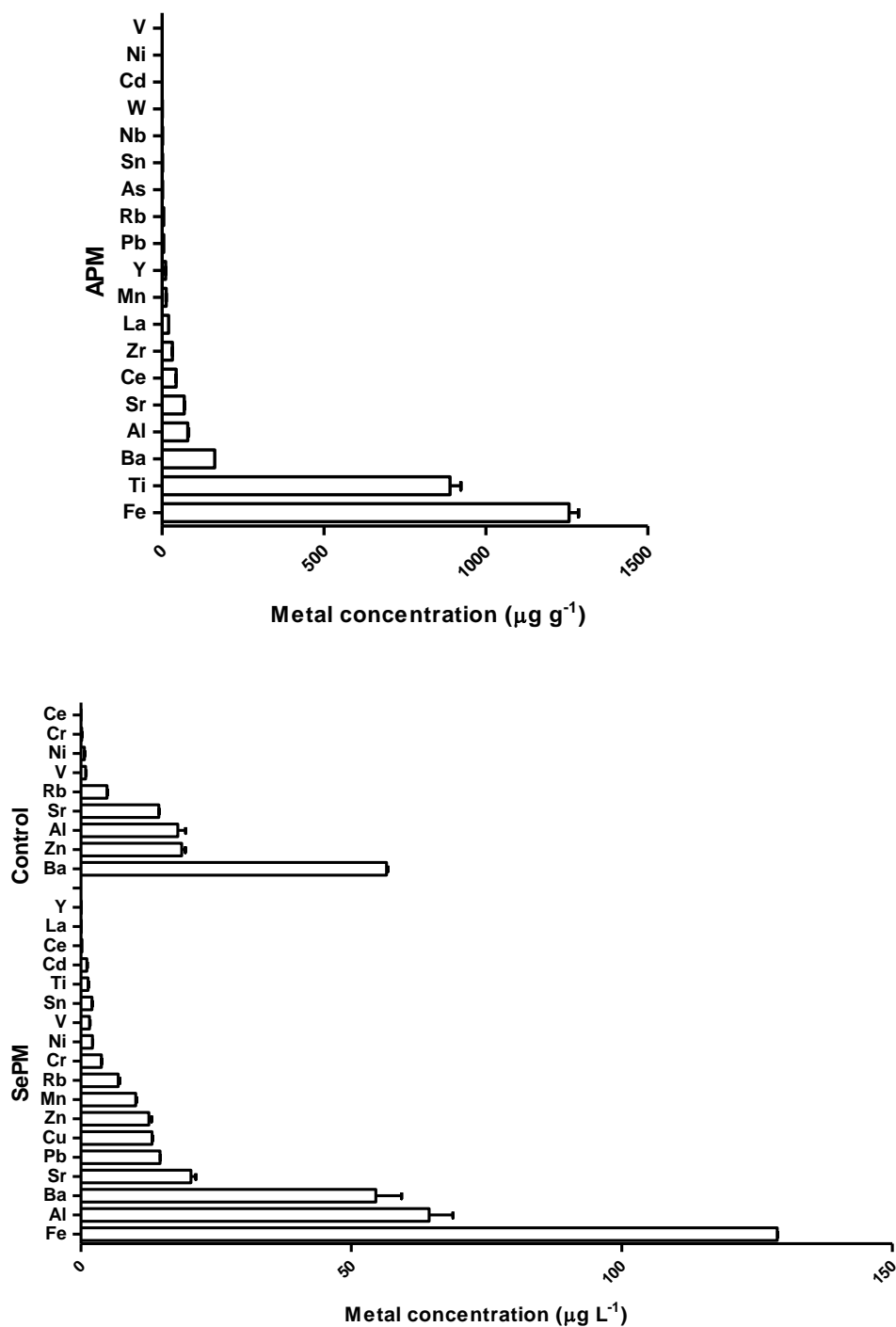


Figure 1. Concentration of metals in atmospheric particulate matter (APM, $\mu\text{g g}^{-1}$) (A), in the water of the control groups ($\mu\text{g L}^{-1}$) and in the group exposed to settleable atmospheric particulate matter (SePM, $\mu\text{g L}^{-1}$) (B). Values are expressed as mean \pm SE. N = 3. Limit of detection (LOD): Al: 0.10; Ti: 0.02; V: 0.05; Cr: 0.05; Mn: 0.38; Fe⁵⁶: 3.89; Ni: 0.06; Cu: 0.45; Zn: 0.17; As: 0.03; Se: 0.06; Nb: 0.237; Rb: 0.06; Sr: 0.09; Y: 0.003; Zr: 0.03; Nb: 0.15; Mo: 0.15; Ag: 0.02; Cd: 0.04; Sn: 0.07; Ba: 0.15; La: 0.0002; Ce: 0.002; W: 0.007; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.19; Bi: 0.12. Limit of quantification (LOQ): Al: 0.28; Ti: 0.05; V:

0.07; Cr: 0.09; Mn: 0.83; Fe⁵⁶: 4.59; Ni: 0.10; Cu: 1.09; Zn: 0.48; As: 0.09; Se: 0.15; Rb: 0.08; Sr: 0.22; Y: 0.004; Zr: 0.08; Nb: 0.37; Mo: 0.06; Ag: 0.05; Cd: 0.05; Sn: 0.2; Ba: 0.31; La: 0.0008; Ce: 0.002; W: 0.02; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.45; Bi: 0.28.

Muscle of tadpoles exposed to SePM had an increase (up to 30 times) of Fe⁵⁶, Ce, Sr, La, Mn, Al, Se, Ti, Cr, Ba, Rb, Ni, V, Cu, Sn, Zr and Y when compared to the control. This may be due to the intense process of metamorphosis, which involves part of the musculature and favors the uptake of metals from the environment. These effects can lead to increased energy requirements and difficulties in swimming, catching food and escaping from predators (Giroto *et al.*, 2020; Krohn *et al.*, 2021).

Contrary to what was observed in the liver and muscle of bullfrog tadpoles, the kidney of the exposed tadpoles showed an increase (about 2-16 times) in Ba, Hg²⁰², Mn and Cu and a decrease (about 1-70 times) in Rb, Sr, V, Cd, Fe⁵⁶, Mo, Al, Ni, Y, Zn, La, Ti and Ce compared to control reinforcing the role of this organ in excretion processes. However, this difference compared with the control group may also be indicative of metal-induced renal dysfunction (Monteiro *et al.*, 2023). Finally, the brain of exposed animals showed an increase (1-40 times) in Ba, Sr, Mo, Fe⁵⁶, Cu, Cr, Mn, W, La, Ce and Y and decrease (2 to 20 times) in Sn, Zn, Ag, Al, Ni, and Ti when compared to control. These results may be related to excessive metal uptake causing a redistribution of metal transport proteins such as ATP7A (ATPase, Cu²⁺ transporting, alpha polypeptide), which promotes enhanced metal efflux and prevents accumulation and toxic effects in the brain (Hung *et al.*, 2010; Dales and Desplat-Jego, 2020). It is therefore reasonable to assume that the metals were taken up by the tadpoles by molecular mimicry and removed from the brain in this way, which could explain the reduction of some metals in the brain compared to the controls.

Table 1. Metal concentration in the organs of bullfrog tadpoles, liver, kidney, muscle and brain in the control and exposed groups to settleable particulate matter (SePM) ($\mu\text{g g}^{-1}$). $\uparrow\downarrow$ Increased or decreased compared to control. Values are expressed as mean \pm S.D.; N = 3. Limit of detection (LOD): Al: 0.10; Ti: 0.02; V: 0.05; Cr: 0.08; Mn: 0.38; Fe⁵⁶: 3.89; Ni: 0.06; Cu: 0.45; Zn: 0.17; As: 0.03; Se: 0.06; Rb: 0.06; Sr: 0.09; Y: 0.003; Zr: 0.03; Nb: 0.15; Mo: 0.02; Ag: 0.02; Cd: 0.04; Sn: 0.07; Ba: 0.15; La: 0.0002; Ce: 0.0007; W: 0.007; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.19; Bi: 0.12. Limit of quantification (LOQ): Al: 0.28; Ti: 0.05; V: 0.07; Cr: 0.09; Mn: 0.83; Fe⁵⁶: 4.59; Ni: 0.10; Cu: 1.09; Zn: 0.48; As: 0.09; Se: 0.15; Rb: 0.08; Sr: 0.22; Y: 0.004; Zr: 0.08; Nb: 0.37; Mo: 0.06; Ag: 0.05; Cd: 0.05; Sn: 0.02; Ba: 0.31; La: 0.0008; Ce: 0.002; W: 0.02; Hg²⁰²: 0.07; Pb: 0.45; Bi: 0.28.

Element s	Liver		Kidney		Muscle		Brain	
	Control	SePM	Control	SePM	Control	SePM	Control	SePM
Al	89.13 \pm 0.42	\uparrow 154.73\pm12.69 (1.73X)	318.64 \pm 5.72	\downarrow 103.81\pm16.10 (3.06X)	6.88 \pm 0.63	\uparrow 49.07\pm3.36 (7.13X)	60.24 \pm 11.63	\downarrow 5.64\pm1.33 (10X)
Ti	0.55 \pm 0.08	\uparrow 5.54\pm0.61 (10X)	11.31 \pm 1.02	\downarrow 1.45\pm0.65 (7.8X)	0.49 \pm 0.08	\uparrow 1.85\pm0.40 (3.77X)	24.58 \pm 3.16	\downarrow 1.19\pm0.24 (21X)
V	0.78 \pm 0.07	\uparrow 1.09\pm0.18 (1.39X)	10.96 \pm 0.91	\downarrow 5.62\pm0.84 (1.95X)	0.21 \pm 0.04	\uparrow 0.36\pm0.08 (1.71X)	5.18 \pm 1.13	4.92 \pm 0.52
Cr	4.35 \pm 1.29	4.25 \pm 0.28	3.79 \pm 0.34	3.90 \pm 1.91	1.24 \pm 0.57	\uparrow 3.52\pm0.99 (2.8X)	8.09 \pm 0.26	\uparrow 10.78\pm2.33 (1.99X)
Mn	1.65 \pm 0.12	1.39 \pm 0.11	3.54 \pm 0.08	\uparrow 11.29\pm1.67 (4.68X)	<LOQ	\uparrow 4.48\pm0.27 (7.59X)	1.37 \pm 0.44	\uparrow 2.88\pm0.28 (2X)
Fe⁵⁶	1699.37 \pm 26.6 2	\downarrow 1320.01\pm25.60 (1.28X)	6820.19 \pm 237.3 1	\downarrow 2745.80\pm170.79 (2.48X)	31.67 \pm 1.99	\uparrow 996.38\pm60.35 (31X)	108.15 \pm 3.68	\uparrow 482.42\pm18.58 (4.4X)
Ni	0.32 \pm 0.11	\uparrow 0.67\pm0.03 (2.09X)	2.88 \pm 0.24	\downarrow 0.88\pm0.40 (3.84X)	<LOQ	\uparrow 0.17\pm0.01 (1X)	1.17 \pm 0.16	\downarrow 0.15\pm0.03 (10X)
Cu	29.43 \pm 0.19	\uparrow 54.07\pm3.35 (1.9X)	<LOQ	\uparrow 16.46\pm0.01 (15.67X)	<LOQ	\uparrow 1.45\pm0.36 (1.47X)	3.65 \pm 0.03	\uparrow 9.09\pm0.26 (2.49X)

Zn	57.04±6.32	↓ 42.37±2.15 (1.34X)	791.20±63.95	↓ 175.30±9.26 (4.51X)	79.66±12.8 4	65.97±14.56 (1.2X)	251.46±35.08	↓ 95.00±0.083 (2.64X)
As	0.16±0.02	0.13±0.02	0.49±0.09	↓ 0.40±0.06	<LOQ	<LOQ	0.32±0.08	0.36±0.08
Se	1.95±0.32	↑ 2.58±0.31 (1.3X)	1.02±0.45	<LOQ	0.78±0.08	↑ 3.01±0.30 (3.85X)	<LOQ	<LOQ
Rb	10.49±1.69	↓ 8.89±0.81 (1.17X)	11.66±1.02	↓ 7.84±0.76 (1.48X)	16.95±0.93	↑ 29.69±0.88 (1.75X)	17.12±1.19	15.12±3.85
Sr	0.38±0.02	↑ 1.79±0.02 (4.79X)	6.44±0.23	↓ 3.27±1.29 (2X)	1.62±0.47	↑ 32.91±1.38 (20.3X)	15.57±2.83	↑ 200.23±41.45 (13X)
Y	0.04±0.01	↑ 0.1±0.003 (2.5X)	0.29±0.05	↓ 0.07±0.05 (4.14X)	<LOQ	↑ 0.03±0.01	<LOQ	↑ 0.08±0.02
Zr	<LOQ	↑ 0.38±0.07	2.40±0.07	<LOQ	<LOQ	↑ 0.09±0.03	<LOQ	<LOQ
Nb	<LOQ	<LOQ	0.51±0.12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Mo	0.61±0.08	0.65±0.12	0.56±0.03	↓ 0.19±0.01 (2.94X)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	↑ 9.02±0.29
Ag	0.09±0.01	0.09±0.02	0.68±0.06	0.81±0.17	<LOQ	<LOQ	1.14±0.19	↓ 0.29±0.04 (3.93X)
Cd	<LOQ	<LOQ	0.56±0.06	↓ 0.23±0.02 (2.43X)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Sn	54.97±1.44	49.55±11.08	664.20±184.54	508.66±101.95	35.36±4.78	↑ 45.53±1.10 (1.28X)	804.92±167.1 4	↓ 375.22±38.82 (2X)
Ba	1.17±0.43	↑ 10.11±0.42 (8.64X)	99.16±27.43	↑ 199.93±1.31 (2X)	18.31±0.53	↑ 41.81±0.21 (2.28X)	<LOQ	↑ 41.29±0.17(41X)
La	0.09±0.04	↑ 0.20±0.01 (2.22X)	0.93±0.02	↓ 0.14±0.00 (6.64X)	0.01±0.00	↑ 0.13±0.00 (13X)	<LOQ	↑ 0.97±0.05
Ce	0.47±0.28	0.48±0.003	4.99±0.06	↓ 0.07±0.01 (71.28X)	<LOQ	↑ 0.25±0.00 (25X)	<LOQ	↑ 1.06±0.01
W	<LOQ	<LOQ	0.03±0.00	0.03±0.00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	↑ 2.13±0.16

Due to the intense rebuilding of organs during metamorphosis, accumulated chemical compounds may be remobilized in the animals, causing damage during this period. Differences in the accumulation of metals in the liver, muscle, kidney and brain may be due to differences in their physiological roles. Studies on the mechanisms of absorption in tadpoles are still scarce. In tadpoles, metals can be absorbed through the gills and skin (Simoncelli *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015; Prokić *et al.*, 2016a; Dubaissi *et al.*, 2018), as these are structures in direct contact with the aquatic environment and are then transported to the liver, kidney, muscle and brain. In the organism, metals can reach the target cell in association with transport proteins (Bridges and Zalups, 2005) and/or using ion channels and membrane transporters (Farina *et al.*, 2011) as described in mammals, so we can assume that the same happened in tadpoles.

Studies by Giroto *et al.* (2020), in which they exposed tadpoles of *A. catesbeiana* to different concentrations of mining tailings from the Fundão dam (Mariana, Brazil), demonstrated the presence of Cd, Pb, Fe, Mn, Zn and Al in the waste, as well as the presence of these metals in the mouth and intestine of exposed animals. In addition to behavioral changes, morphological and physiological damage, tadpoles showed a decrease in swimming speed (acute exposure, 96 h and chronic exposure, 16 days) and a decrease in oxygen consumption (chronic exposure, 20 days). For example, Veronez *et al.* (2016) reported systemic bioaccumulation of Fe and Mn after exposure to isolated metals or their mixture as iron ore in *A. catesbeiana* tadpoles. Krohn *et al.* (2021) detected Pb, Ni, Mn and Fe at levels 35, 26, 23 and 14 times higher in the pre-metamorphic (G25) than in the post-metamorphic (G42) in wild frog tadpoles (*Lithobates sylvaticus*) reared in an environment contaminated with diluted bitumen. High levels of V, Mo and Cd were observed without negative effects on tadpole development, and Zn was the only metal with the highest concentration in post-metamorphic tadpoles. In *Pelophylax perezii* tadpoles exposed to dilute eucalyptus and pine ash containing metals (such as As, Cd, Co, Cr, Cu, Pb, V, Mn, Ni and Zn) for 14 days, Santos *et al.* (2023) observed mortality at the highest ash concentrations and reductions in body length and weight. These studies showed that metal accumulation depends on the developmental stage of these animals.

However, in the present study, the highest BCF values of the metals were found for Sn (in kidney and brain, 250.57 and 184.83, respectively and in liver and muscle about

24), Fe⁵⁶ (in the kidney, liver, muscle and brain, 21, 10, 7 and 4, respectively), Zn (in the kidney, 13.94, brain, 7.55 and muscle, 5.24), La, Sr and Ce (in the brain, 13.85, 9.42 and 5.05, respectively). Ti, Cu, Zn, Ce, La and Al had factors in the range of 4.19 to 2.40 in the liver; Ba, V and La in the kidney ranged from 3.66 to 1.93; Rb and Ti ranged from 4.29 to 1.4 in muscle and V, Cr, Rb and Y had factors in the range of 3.05 to 1.33 in the brain in tadpoles exposed to SePM (Table 2). Similar factors ranging from 0.01 to 1.6 were calculated for Cd, Al, Ti, V, Cr, Mn, Ni, Cu, Rb, Sr, Y, Ba, Ce, Pb, and La in tissues of tadpoles exposed to SePM. Metals in water can be absorbed by aquatic biota. These contaminants can bioaccumulate, even at very low concentrations, more specifically in the liver (Agah *et al.* 2009; Prokić *et al.*, 2016b; Carvalho *et al.*, 2017; Santos *et al.* 2023). Higher BCFs may be a consequence of the greater bioavailability of these metals in water, and therefore their concentrations in organisms may be higher than in the environment, leading to changes in the function of these organs.

The increased concentrations of Sn, Fe and Zn may be due to the specific kinetic properties and physiological mechanisms of these metals involving absorption, distribution, accumulation and excretion (Kelepertzis *et al.*, 2012). The presence of V has been observed in metal-exposed tadpoles (Rowe *et al.*, 2011, Krohn *et al.*, 2021). Non-essential metals in the environment, such as V and Pb, can be derived from the mining and refining of crude oil (Krohn *et al.*, 2021) and ash from wildfires (Wu *et al.*, 2017; Jesus *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023).

Table 2. Bioconcentration Factor (BCF) in tissues of the bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana* exposed to 1 g L⁻¹ of SePM for 96 h. The BCF was calculated as the metal concentration in organs (µg g⁻¹) divided by the metal concentration in water (µg L⁻¹). (N = 3, both for tissues and water).

Bioconcentration Factor (BCF)				
Elements	Liver	Kidney	Muscle	Brain
Al	2.40	1.61	0.76	0.14
Ti	4.19	1.10	1.40	0.90
V	0.67	3.49	0.22	3.05
Cr	1.11	1.02	0.86	2.82
Mn	0.13	1.11	0.44	0.24
Fe ⁵⁶	10.24	21.31	7.73	3.74
Ni	0.31	0.34	0.05	0.05
Cu	4.11	1.25	0.11	0.69
Zn	3.37	13.94	5.24	7.55
Rb	1.28	1.13	4.29	2.07
Sr	0.08	0.12	1.61	9.42
Y	1.66	1.15	0.49	1.33
Cd	0.01	0.20	0.00	0.00
Ba	0.18	3.66	0.76	0.75
Ce	2.30	0.32	0.72	5.05
Pb	0.08	0.02	0.02	0.01
La	2.86	1.93	1.00	13.85
Sn	24.40	250.57	22.42	184.83

Regarding biochemical biomarkers there was no variation in LPO, MDA (by TBARs) and MT in the tadpole's kidney exposed to SePM. However, LPO and MDA increased in muscle by 89% (P = <0.001) and 35% (P = 0.017) respectively, and MT decreased (P = <0.001) in this organ by about 21% after exposure to SePM (Table 3). The accumulation of metals in muscle can lead to impaired function and free radical imbalance (characterized by increased LPO and MDA), resulting in oxidative damage in the tissues of bullfrog tadpoles. MT can act as an antioxidant, in addition to binding to metals to maintain homeostasis (Carvalho *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2020), and is

a sensitive biomarker of aquatic metal pollution. A metal-induced increase in MT content was also recorded in the fish, *Cathorops spixii* (Gusso-Choueri *et al.*, 2015) and bullfrog tadpoles exposed to river water containing As, Zn, Cu, Cr, Cd and Pb (Ossana *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2017), but combined metals also inhibited MT in carp, *Carassius auratus*, exposed to Cu, fluorene and fluoranthene (Lu *et al.*, 2018). This inhibition may be due to competition for cysteine residues for GSH synthesis, as well as to a suppression of metal ion elimination and the consequent metal accumulation (Van Den Hurk *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2018).

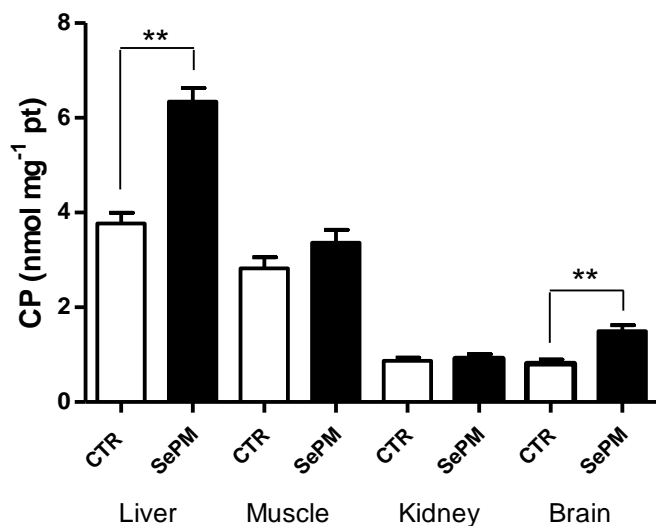
CP increased ($P = <0.001$) in the liver (68%) and brain (85%) ($P = 0.002$) without effects in muscle and kidney (Figure 2). Increased CP in these organs is an indication of cellular damage due to oxidative stress caused by exposure to SePM. It is known that reactive oxygen species (ROS) can convert amino groups of proteins to carbonyl groups ($=CO$) and alter the structure and function of proteins, leading to loss of function. Oxidation by metals can introduce carbonyl groups into proteins (Fedorova *et al.*, 2014). Thus, protein carbonylation leading to protein oxidation and increased ROS formation, may be associated with the action of SePM which is supported by the decrease in CAT and increase in GPx and NOS enzymes in the liver described below.

SOD showed no significant change in its activity (Figure 3A). CAT enzymes decreased (45-50%) in the liver ($P = 0.002$) and muscle ($P = <0.001$) and increased in kidney ($P = 0.049$) (Figure 3B), while GPx increased ($P = <0.001$) in the liver (approximately 59%) and in the kidney (about 172%) and decreased ($P = <0.001$) in the muscle (50%) (Figure 3C). Our results suggest that levels of metals (Al, Ti, V, Ni, Cu, Se, Sr, Y, Zr, Ba, La and Pb) in the liver and muscle of tadpoles suppressed CAT activity (45-50%) (Figure 3). The inhibition may be due to metals binding to the active sites of this enzyme or the ROS generated by metals, which may suppress the activity of this enzyme, leading to cytotoxicity, as observed by Cui *et al.* (2020) in the larvae of the fish, *Paralichthys olivaceus* exposed to Cd and in acidified seawater. On the other hand, Fe and Mn combined with iron ore increased CAT activity in the liver of *A. catesbeiana* tadpoles (Veronez *et al.*, 2016) and *Pelophylax kl. esculentus* frog populations from two rivers in Serbia containing Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb and Zn (Prokić *et al.*, 2016b). Indeed, Peluso *et al.* (2020) found higher CAT activity in embryos than in larvae of *Rhinella arenarum* exposed to river water samples containing As, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn in addition to pesticides.

Table 3. Lipid peroxidation (LPO, nmol mg⁻¹ pt), Malondialdehyde (MDA, nmol mg⁻¹ pt) and metallothioneins (MT, nmol SH mg⁻¹ pt) levels in liver, kidney and muscle of *Aquarana catesbeiana* from control (CTR) and exposed to SePM (SePM). Values are expressed as mean \pm SE ($n = 6-8$). Values that are in bold show significant difference ($p < 0.05$) compared to the control.

Biomarkers	CTR	SePM
<i>Liver</i>		
LPO	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.003
MDA	69.36 \pm 6.20	70.21 \pm 5.35
MT	18.09 \pm 0.63	16.80 \pm 0.47
<i>Kidney</i>		
LPO	2.80 \pm 0.28	2.61 \pm 0.45
MDA	352.64 \pm 44.36	417.70 \pm 40.74
MT	60.22 \pm 4.15	56.31 \pm 4.74
<i>Muscle</i>		
LPO	0.09 \pm 0.005	0.17 \pm 0.01 \uparrow (89%)
MDA	192.83 \pm 21.57	260.81 \pm 13.91 \uparrow (35%)
MT	30.51 \pm 1.44	24.26 \pm 0.56 \downarrow (21%)

Figure 2. Carbonyl proteins (CP, $\text{nmol}^{-1} \text{mg pt}$) levels in liver, muscle, kidney and brain of *Aquarana catesbeiana* from control (CTR) and exposed to settleable atmospheric particulate matter (SePM). Values are expressed as mean \pm SE ($n = 6-8$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



The increase in GPx activity in the liver and kidney suggests oxidative stress, which can be verified by the increase in CP in the liver, both induced by the presence of metals in this organ, and the kidney is an excretory organ, although it had the lowest concentration of metals (Figure 3C). Even the increase in GPx may not be sufficient to effectively eliminate H_2O_2 , predisposing the animal to impaired antioxidant protection leading to oxidative damage to lipids and functional proteins. It may also mean that GPx is involved in active detoxification of metals by various mechanisms, such as the breakdown of H_2O_2 to O_2 and H_2O or the conversion of lipid hydroperoxides to less toxic hydroxyl products (Borković-Mitić *et al.*, 2016). However, the decrease in GPx activity, accompanied by a significant increase in LPO and MDA levels in the muscle, can lead to cell damage, energy expenditure and impaired development in this animal. Consistent with this, Zheng *et al.* (2021) demonstrated that a decrease in SOD and GPx expression in the digestive tract of *Bufo gargarizans* exposed to Cd and Pb, isolated or combined, characterizing oxidative and tissue damage. In addition, the authors observed that the mixture of metals may cause greater energy expenditure and resistance to detoxification of metals than exposure to isolated metals.

The biotransformation enzyme, GST, increased ($P = <0.001$) 119% its activity in the liver and decreased ($P = 0.004$) in the kidney and muscle (52% and 74%, respectively)

(Figure 3D). GST can also be used as a biomarker of metal exposure in tadpoles and this enzyme is involved in the conjugation of electrophilic metabolites (phase II) with reduced glutathione (GSH) to form the water-soluble metabolite (Samanta *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2021). The increase in GST activity in the liver after exposure to SePM indicates that this enzyme is involved in the mechanism of protection against oxidative stress caused by metals. *A. catesbeiana* tadpoles exposed to iron ore, Fe and Mn showed higher hepatic GST activities and accumulation of Fe and Mn, which induced oxidative stress with genotoxic and developmental effects (Veronez *et al.*, 2016).

Decreases in GST activity were also observed in *Euphlyctis cyanophlyctis* tadpoles exposed to As by Samanta *et al.* (2020) and in *P. perezii* tadpoles exposed to As, Cd, Co, Cr, Cu, Pb, V, Mn, Ni and Zn from eucalyptus and pine ash by Santos *et al.* (2023), indicating the potential to induce oxidative stress, either directly by inhibiting enzyme activity or indirectly by decreasing the concentration of the reduced glutathione (Dobrovoljc *et al.*, 2012; Prokić *et al.*, 2016b; Dobritsch *et al.*, 2020).

The activity of enzymes can be altered in the presence of metals by binding them to their functional groups, such as the sulfhydryl group, and also by displacing the metal bound to the enzyme (Viarengo *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2009; Gusso-Choueri *et al.*, 2015; Prokić *et al.*, 2016b). For example, Hg (3.12 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) inhibited *Pomatoschistus microps* AChE more efficiently than Cu (25 to 400 μg^{-1}) (Vieira *et al.*, 2009) and the inhibition was concentration dependent. These results suggest neurotoxic effects with impairment of neuromuscular functions in these fish. On the other hand, we found a higher ($P = <0.001$) ChE activity (92%) in *A. catesbeiana* muscle exposed to SePM (Figure 3E), which may be related to an increase in metals detected in this tissue with increase in muscle contraction. This enzyme overproduction may lead to tissue dysfunction and impaired neuromuscular transmission in these animals.

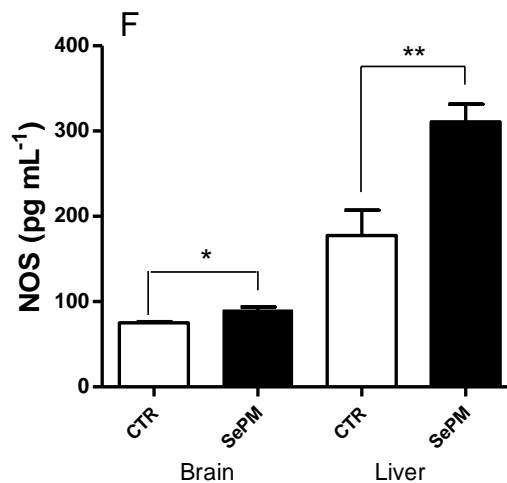
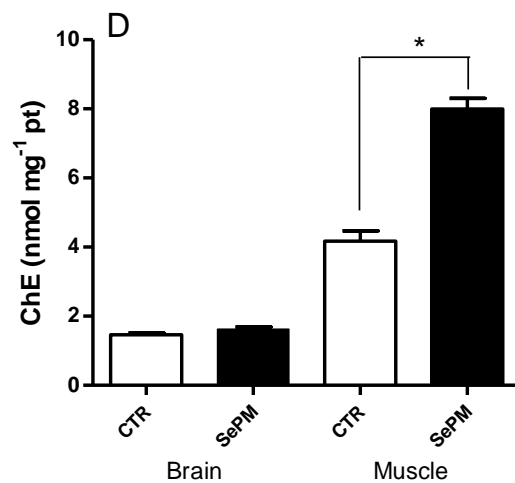
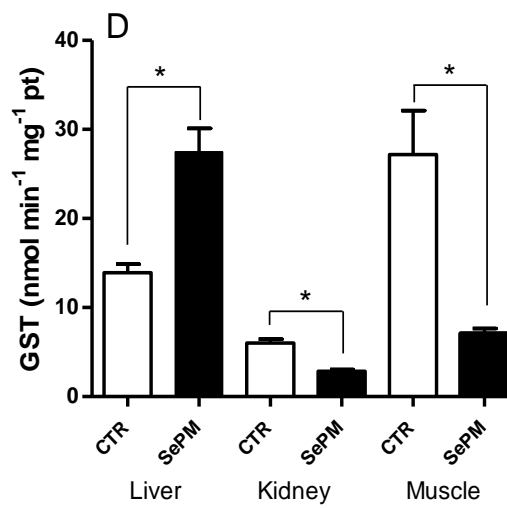
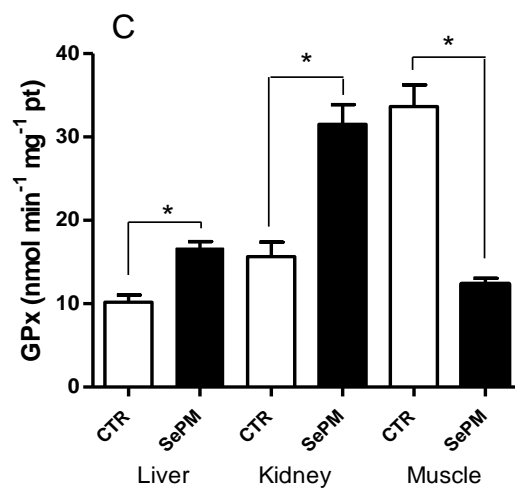
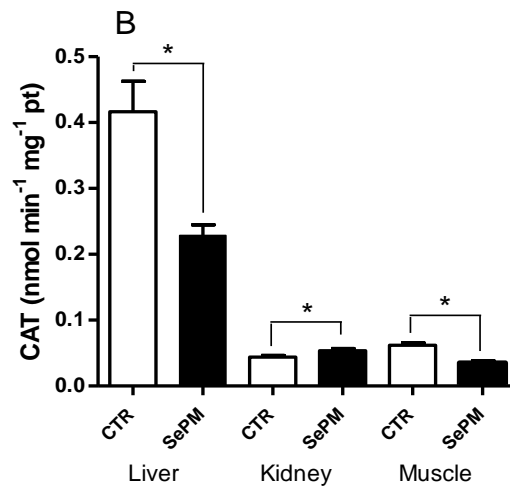
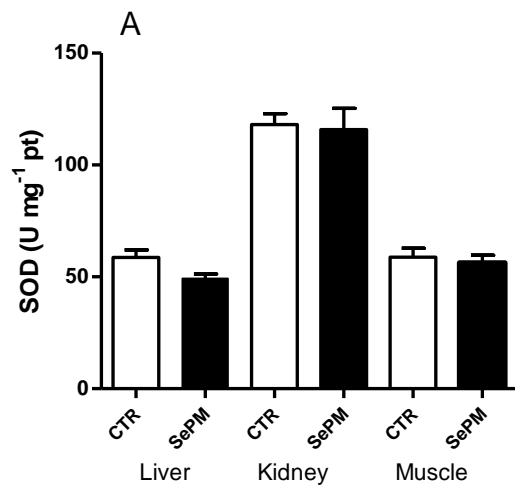
Several isoforms of NOS are involved in the synthesis of nitric oxide (NO), an endogenously synthesized signaling molecule that has several physiological effects in vertebrates. However, high iNOS activity can produce large amounts of NO over long periods of time (hours/days) and can have toxic effects (Peter *et al.*, 2022). In the present study, increased NOS activity (75%) in the brain ($P = 0.042$) and liver ($P = 0.004$) of tadpoles indicates a mobilization of NO, which is a strong antioxidant molecule, in response to the stress caused by the metals (Figure 3F). However, studies on this enzyme

in tadpoles are still scarce. A similar result was observed in bullfrog tadpoles, with an increase in NOS activity in the liver after exposure of these animals to river water containing metals (Utsunomiya *et al.*, 2022).

To examine the relationships between biomarkers and metal concentrations in tadpole organs (Supplementary material 2), and also the relationships between biomarkers and interactions in each organ (Supplementary material 3), we performed Pearson correlations. Statistically significant correlations are highlighted in the tables. Al, Ti, V, Ni, Cu, Se, Sr, Y, Zr, Ba and La, present in the liver (L), showed a positive correlation with the biomarkers CP, GPx, GST and NOS while Mn, Fe⁵⁶, Zn and As for the biomarkers LPO, CAT, SOD and MT; the concentration of MDA, correlated positively with Cr, Mo and Ag (Supplementary material 2A). When compared with each other, there is a positive correlation between CP, GPx, GST and NOS (Supplementary material 3A), showing the possibility that the responses of these biomarkers directly interfere with each other, only MDA does not correlate with the other biomarkers. In the kidney (Supplementary material 2B), antagonistic responses were observed between the biomarkers GST and GPx for metals bioaccumulating in the organ, except for Rb and W, where the effect of a metal, such as the bioaccumulation of Al in the organ, is positively related to GST activity and negatively related to GPx. The same behaviour was observed between the CAT and the biomarkers MDA and GPx for many of the metals present. These inversely proportional interactions can also be observed between these biomarkers (Supplementary material 3B), where a negative correlation is shown. Prović *et al.* (2016b) also found a positive correlation with Fe and SH groups in skin and liver of *Pelophylax kl. sculentus* and Carvalho *et al.* (2017) with Zn, Cu and Cd and MT in liver of *A. castesbeiana*. In muscle, metals showed positive correlation with biomarkers LPO, ChE, CAT and CP, and negative correlation with GPx, GST and MT (Supplementary material 2C). A positive correlation was also described by Prokić *et al.* (2016b) in the muscle of the frog *Pelophylax kl. esculentus* between Ni and ChE, and in the case of negative correlations, metals promote oxidative stress and deplete antioxidants, making it the most susceptible animal to ROS (Prokić *et al.*, 2016; Veronez *et al.*, 2016). The relationships between biomarkers are confirmed for LPO, CP, CAT and ChE, and also for the biomarkers GPx, GST and MT (Supplementary material 3C), with LPO and ChE exhibiting a negative correlation to the three previously mentioned biomarkers. For the brain, Cr, Mn, Fe, Cu, Sr, Y, Mo, Ba, La, Ce and W showed a positive correlation for CP,

ChE and NOS while Al, Ti, Ni, Zn, Ag and Hg showed a positive correlation negative for CP (Supplementary material 2D). Correlations confirm the interaction between biomarkers (Supplementary material 3D).

Figure 3. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST) activities in liver, kidney and muscle; Cholinesterase activity (ChE) of the brain and muscle; Nitric oxide synthase (NOS) activity of the brain and liver; of *Aquarana catesbeiana* from control (CTR) and exposed to settleable atmospheric particulate matter (SePM). Values are expressed as mean \pm SD. * P < 0.05; ** P < 0.01. (N = 6-8).



Correlation analyses show that the same variable may behave differently from others, and may have a strong correlation with a particular metal but a negative correlation with a biomarker. This complexity of responses may be related to specific factors in each biochemical pathway, between reaction stages, and even in the imbalance of gene expression (Woo *et al.*, 2009; Kaczor-Kamińska *et al.*, 2020). Beyond that, the combination of metals and the organ in which these elements are found can cause different effects for the same biomarker (Prokić *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017), as well as the different exposure times between the organism and the environment (Carvalho *et al.*, 2020).

Conclusion

The exposure to SePM resulted in metal accumulation in the liver, muscle and brain and oxidative stress in the organs of *A. catesbeiana* tadpoles, negatively affecting this species. Positive or negative correlations between metals and biomarkers may contribute to such effects, highlighting the complexity of the effects of metals in the aquatic environment. This study confirms the need for research to understand the effects of short and long-term exposure of amphibians to SePM, such as biochemical, physiological, morphological, embryological, and molecular changes, and histopathological effects. In addition, we highlight the importance of studying tadpoles and analyzing biomarkers and metal accumulation in different tissues, as each one may respond according to its function. We also highlight the importance of developing studies that could help guide ecotoxicological research to demonstrate the risks posed by exposure and/or contact with APMs.

Declarations

CRedit authorship contribution statement

Conceptualization: C.S.C., M.N.F., D.A.M., I.C.S.; data curation: C.S.C., D.A.M., I.C.S.; formal analyses: C.S.C., D.A.M., I.C.S., M.V.M., I.F.F., G.H.F., H.S.M.U., R.I.C., L.B.C.; investigation: C.S.C., D.A.M., I.C.S., I.F.F., H.S.M.U.; Methodology: C.S.C., D.A.M., I.C.S., I.F.F., G.H.F., H.S.M.U.; Project administration: M.N.F.; Resources: C.S.C., D.A.W., M.N.F.; Supervision: C.S.C.; Validation: C.S.C., D.A.M., I.C.S., M.V.M., M.N.F.; Visualization: C.S.C., I.C.S.; Roles/Writing - original draft:

C.S.C., I.F.F., G.H.F., H.S.M.U., I.C.S.; Writing - review & editing: C.S.C., I.F.F., G.H.F., H.S.M.U., I.C.S.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant 2019/08491-0 and 2017/23781-9), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT PICT-2015-2819) and Secretaría de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC 411/18). I.C. Souza received scholarship support from the Federal Brazilian Government parliamentary amendment administered by Espírito Santense Foundation of Technology - FEST (Grant 23068.044486/2021-41, 39/2021) and the student would like to thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the scholarships. The authors did not use generative AI and AI-assisted technologies in the writing process.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available in this published article. Additional data are available upon request from the corresponding author.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Data availability Ethics approval Consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

All the authors agreed with the present publication.

References

- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London, pp. 671-684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.X5001-4>
- Adorno, H.A., Souza, I.C., Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A., Fernandes, M.N., Monteiro, D.A., 2023. A multi-biomarker approach to assess the sublethal effects of settleable atmospheric particulate matter from an industrial area on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Total Environ.* 856, Part 2. 159168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>.
- Agah, H., Leermakers, M., Elskens, M., Fatemi, S.M., Baeyens, W., 2009. Accumulation of trace metals in the muscle and liver tissues of five fish species from the Persian Gulf. *Environ. Monit. Assess.* 157 (1-4), 499-514. <https://doi:10.1007/s10661-008-0551-8>.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. (E 729-96). 2000. In: *Annual Book of Standards*, v. 11.05, Section 11. Philadelphia, PA, p. 220-240.
- Bogo, H., Otero, M., Castro, P.C., Ozafrán, M.J., Kreiner, A., Calvo, E.J., Martín Negri, R., 2003. Study of atmospheric particulate matter in Buenos Aires city. *Atmos. Environ.*, 37 (8), 1135-1147. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00977-9](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00977-9).
- Borković-Mitić, S.S., Prokić, M.D., Krizmanić, I.I., Mutić, J., Trifković, J., Gavrić, J., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Pavlović, S.Z., Saičić, Z.S., 2016. Biomarkers of oxidative stress and metal accumulation in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 9649-9659 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6194-3>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. [https://doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharm.* 204 (3), 274-308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>

- Carvalho, C.S., Utsunomiya, H.S.M., Pasquoto, T., Lima, R., Costa, M.J., Fernandes, M.N., 2017. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environ. Pollut.* 221, 445-452. [https://doi: 10.1016/j.envpol.2016.12.012](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012).
- Carvalho, C.S., Utsunomiya, H.S.M., Pasquoto, T., Costa, M.J., Fernandes, M.N., 2020. Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110560>
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357 de 17/03/2005. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento.
- Cui, W.T., Cao, L., Liu, J.H., Ren, Z.H., Zhao, B., Dou, S.Z., 2020. Effects of seawater acidification and cadmium on the antioxidant defense of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Sci. Total Environ.* 718:137234. [https://doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137234](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137234)
- Dales, J.-P., Desplat-Jégo, S., 2020. Metal imbalance in neurodegenerative diseases with a specific concern to the brain of multiple sclerosis patients. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9105. <https://doi.org/10.3390/ijms21239105>
- Dobrovoljc, K., Falnoga, I., Žnidarič, M.T., Mazy, D., Ščančar, J., Bulog, B., 2012. Cd, Cu, Zn, Se, and metallothioneins in two amphibians, *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata) and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). *Biol. Trace Elem. Res.* 150, 178-194. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9461-2>
- Duan, J., Hu, H., Zhang, Y., Feng, L., Shi, Y., Miller, M.R., Sun, Z., 2017. Multi-organ toxicity induced by fine particulate matter PM2.5 in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Chemosphere* 180, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.013>.
- Dubaissi, E., Rousseau, K., Hughes, G.H., Ridley, C., Grecis, R.K., Roberts, I.S., Thornton, D., 2018. Functional characterization of the mucus barrier on the *Xenopus tropicalis* skin surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 115 (4), 726-731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713539115>

- Dobritzsch, D., Grancharov, K., Hermsen, C., Krauss, G.-J., Schaumlöffel, D., 2020. Inhibitory effect of metals on animal and plant glutathione transferases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 57, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.09.007ff>.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- EPA (USA Environmental Protection Agency) Creed, J.T., Brockhoff, C.A., Martin, T.D., 1994. Method 200.8, Revision 5.4. Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry. https://www.epa.gov/sites/.../method_200-8_rev_5-4_1994.pdf.
- Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B.T., 2011. Special issue: Environmental chemicals and neurotoxicity oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256 (3), 405-417. <https://doi:10.1016/j.taap.2011.05.001>.
- Fedorova, M., Bollineni, R.C., Hoffmann, R., 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* 33 (2), 79-97. <https://doi:10.1002/mas.21381>.
- Federici, G., Shaw, B., Handy, R., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84 (4), 415-430. <https://doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Fernandes, I.F., Utsunomiya, H.S.M., Valverde, B.S.L., Cassiel Ferraz, J.V., Fujiwara, G.H., Gutierrez, D.M., de Oliveira, C., Belussi, L.F., Fernandes, M.N., Carvalho, C.S., 2021. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Chemosphere* 275, 130000. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130000>.
- Flohe, I., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114-121. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1).
- Galvão, E.S., Santos, J.M., Reis Junior, N.C., Feroni, R.S., Orlando, M.T.D., 2022. The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and

- sources in an industrialized region of southeastern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 194, 88. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09710-x>.
- Giroto, L., Espíndola, E.L.G., Gebara, R.C., Freitas, J.S., 2020. Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the Dam rupture in Mariana, MG (Brazil). *Water Air Soil Pollut.* 231 (7). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04691-y>
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Austin 16, 183-190.
- Guo, C., Lv, S., Liu, Y., Li, Y., 2022. Biomarkers for the adverse effects on respiratory system health associated with atmospheric particulate matter exposure. *J. Hazard. Mat.* 421, 126760. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126760>.
- Gusso-Choueri, P.K., Choueri, R.B., de Araújo, G.S., Cruz, A.C.F., Stremel, T., Campos, S., Abessa, D.M.S., Oliveira Ribeiro, C.A., 2015. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 18047-18065. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4911-y>
- Hadei, M., Naddafi, K., 2020. Cardiovascular effects of airborne particulate matter: A review of rodent model studies. *Chemosphere* 242. 125204. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125204>.
- Hartono, D., Lioe, B., Zhang, Y., Li, B., Yu, J., 2017. Impacts of particulate matter (PM_{2.5}) on the behavior of freshwater snail *Parafossarulus striatulus*. *Sci. Rep.* 7, 644. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00449-5>
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M., 2010. The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp. Biol.* 213 (6), 921-933. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>
- Huang, Y., Tang, H., Jin, J., Fan, M., Chang, A.K., Ying, X., 2020. Effects of waterborne cadmium exposure on its internal distribution in *Meretrix meretrix* and detoxification by metallothionein and antioxidant enzymes. *Front. Mar. Sci.* 7, 502. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00502>.

- Hung, Y.H., Bush, A.I., 2010. Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (1), 61-76. <https://doi:10.1007/s00775-009-0600-y>.
- Jayawardena, U.A., Angunawela, P., Wickramasinghe, D.D., Ratnasooriya, W.D., Udagama, P.V., 2017. Heavy metal-induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (10), 2855-2867. <https://doi:10.1002/etc.3848>.
- Jesus, F., Mesquita, F., Virumbrales Aldama, E., Marques, A., Gonçalves, A.M.M., Magalhães, L., Nogueira, A.J.A., Ré, A., Campos, I., Pereira, J.L., Gonçalves, F.J.M., Abrantes, N., Serpa, D., 2023. Do freshwater and marine bivalves differ in their response to wildfire ash? Effects on the antioxidant defense system and metal body burden. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 20 (2). <https://doi.org/10.3390/ijerph20021326>
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolf, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange - comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids* 26 (10), 853-856. <https://doi:10.1007/BF02536169>.
- Kaczor-Kamińska, M., Sura, P., Wróbel, M., 2020. Multidirectional changes in parameters related to sulfur metabolism in frog tissues exposed to heavy metal-related stress. *Biomolecules* 10 (4), 574. <https://doi.org/10.3390/biom10040574>
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251 (20), 6183-6188.
- Kelepertzis, E., Argyraki, A., Valakos, E., Daftsis, E., 2012. Distribution and accumulation of metals in tadpoles inhabiting the metalliferous streams of eastern Chalkidiki, northeast Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63 (3), 409-420. <https://doi:10.1007/s00244-012-9775-2>.
- Krohn, R.M., Palace, V., Smits, J.E.G., 2021. Metal changes in pre- and post-metamorphic wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles: Implications for ecotoxicological studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 760-768. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00735-w>.
- Lakey, P.S.J., Berkemeier, T., Tong, H., Arangio, A.M., Lucas, K., Poschl, Shiraiwa, M., 2016. Chemical exposure-response relationship between air pollutants and reactive

- oxygen species in the human respiratory tract. *Sci. Rep.* 6, 32916. <https://doi.org/10.1038/srep32916>.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346-357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- Lu, G., Wu, H., Ding, J., 2018. Interactive effects of copper, fluorene, and fluoranthene on enzymatic biomarkers and metallothionein levels in crucian carp (*Carassius auratus*). *Pol. J. Environ. Stud.* 27(1), 183-190. <https://doi.org/10.15244/pjoes/75809>
- Machado, M., Reisen, V.A., Santos, J.M., Junior, N.C.R., Frère, S., Bondon, P., Ispány, M., Cotta, H.H.A., 2020. Use of multivariate time series techniques to estimate the impact of particulate matter on the perceived annoyance. *Atmos. Environ.* 222, 117080. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117080>.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6053.
- Monteiro, R., Souza, I.C., Morozesk, M., Soares, M.P., De Angelis, C.F., Vieira, N.S., Bendhack, F., Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A., Fernandes, M.N., 2023. 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* 330, 138715. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138715>.
- Mouchet, F., Teaniniuraitemoana, V., Baudrimont, M., Daffe, G., Gauthier, L., P. Gonzalez, P., 2015. Recovery capabilities of *Xenopus laevis* after exposure to cadmium and zinc. *Chemosphere* 139, 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.103>.
- Noman, M.A., Feng, W., Zhu, G., Hossain, M.B., Chen, Y., Zhang, H., Sun, J., 2022. Bioaccumulation and potential human health risks of metals in commercially important fishes and shellfishes from Hangzhou Bay, China. *Sci. Rep.* 12, 4634. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08471-y>
- Ossana, N.A., Castane, P.M., Saliban, A., 2013. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the

- Reconquista River (Argentina). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 65 (3), 486-497. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9920-6>
- Paetow, L.J., McLaughlin, J.D., Pauli, B.D., Marcogliese, D.J., 2013. Mortality of American bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* infected by *Gyrodactylus jennyae* and experimentally exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis*. J. Aquat. Anim. Health 25 (1), 15-26. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.722170>
- Peluso, J., Aronzon, C.M., Rios de Molina, M.D.C., Rojas, D.E., Cristos, D., Pérez Coll, C.S., 2020. Integrated analysis of the quality of water bodies from the lower Parana River basin with different productive uses by physicochemical and biological indicators. Environ. Pol. 263, 114434. <https://doi: 10.1016/j.envpol.2020.114434>.
- Peter, M.C., Subhash, G.R., Peter, V.S., 2022. Inducible nitric oxide synthase/nitric oxide system as a biomarker for stress and ease response in fish: Implication on Na⁺ homeostasis during hypoxia. Front. Physiol. 13. <https://doi:10.3389/fphys.2022.821300>
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur. J. Med. Chem. 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Popoola, L.T., Adebajo, S.A., Adeoye, B.K., 2018. Assessment of atmospheric particulate matter and heavy metals: a critical review. Int. J. Environ. Sci. Technol. 15, 935-948. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1454-4>
- Prokić, M.D., Borković-Mitić, S.S., Krizmanić, I.I., Mutić, J.J., Trifković, J.Đ., Gavrić, J.P., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Pavlović, L.Z., Saičić, Z.S., 2016a. Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. Ecotoxicology 25, 1531-1542. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1707-x>
- Prokić, M.D., Borković-Mitić, S.S., Krizmanić, I.I., Mutić, J.J., Vukojević, V., Nasia, M., Gavrić, J.P., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Pavlović, S.Z., Saičić, Z.S., 2016b. Antioxidative responses of the tissues of two wild populations of *Pelophylax kl. esculentus* frogs to heavy metal pollution. Ecotoxicol. Environ. Saf. 128, 21-29. <https://doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.005>.

- Pryor, J.T., Cowley, L.O., Simonds, S.E., 2022. The physiological effects of air pollution: particulate matter, physiology and disease. *Front. Public Health.* 14 (10), 882569. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.882569>.
- Romanova, E.B., Ryabinina, E.S., Boryakov, A.V., 2021. Heavy metal accumulation in the tissues and organs of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) and *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) (Amphibia: Ranidae) inhabiting the waterbodies of Nizhny Novgorod. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 48, 1862-1869. <https://doi.org/10.1134/S1062359021100228>.
- Rowe, C.L., Heyes, A., Hilton, J., 2011. Differential patterns of accumulation and clearance of dietary selenium and vanadium during metamorphosis in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *Arch. Environ. Con. Tox.* 60, 336-342.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Ghosh, A.R., 2020. Acute toxicity assessment of arsenic, chromium and almix 20WP in *Euphlyctis cyanophlyctis* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 191, 110209. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110209>
- Santos, J.M., Reis, N.C., Galvão, E.S., Silveira, A., Goulart, E.V., Lima, A.T., 2017. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (27), 22026-22039. <https://doi.org/10.1029/2010RG000328>.
- Santos, D., Abrantes, N., Campos, I., Domingues, I., Lopes, I., 2023. Effects of aqueous extracts of wildfire ashes on tadpoles of *Pelophylax perezii*: Influence of plant coverage. *Sci. Total Environ.* 854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158746>.
- Simoncelli, F., Belia, S., Di Rosa, I., Paracucchi, R., Rossi, R., La Porta, G., Lucentini, L., Fagotti, A., 2015. Short-term cadmium exposure induces stress responses in frog (*Pelophylax bergeri*) skin organ culture. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.001>.
- Singh, P., Dey, M., Ramanujam, S.N., 2016. Bioaccumulation of heavy metals in anuran tadpoles: A study in Barak Valley, Assam. *Int. J. Aquat. Biol.* 4 (3), 171-178. <https://doi.org/10.22034/ijab.v4i3.177>

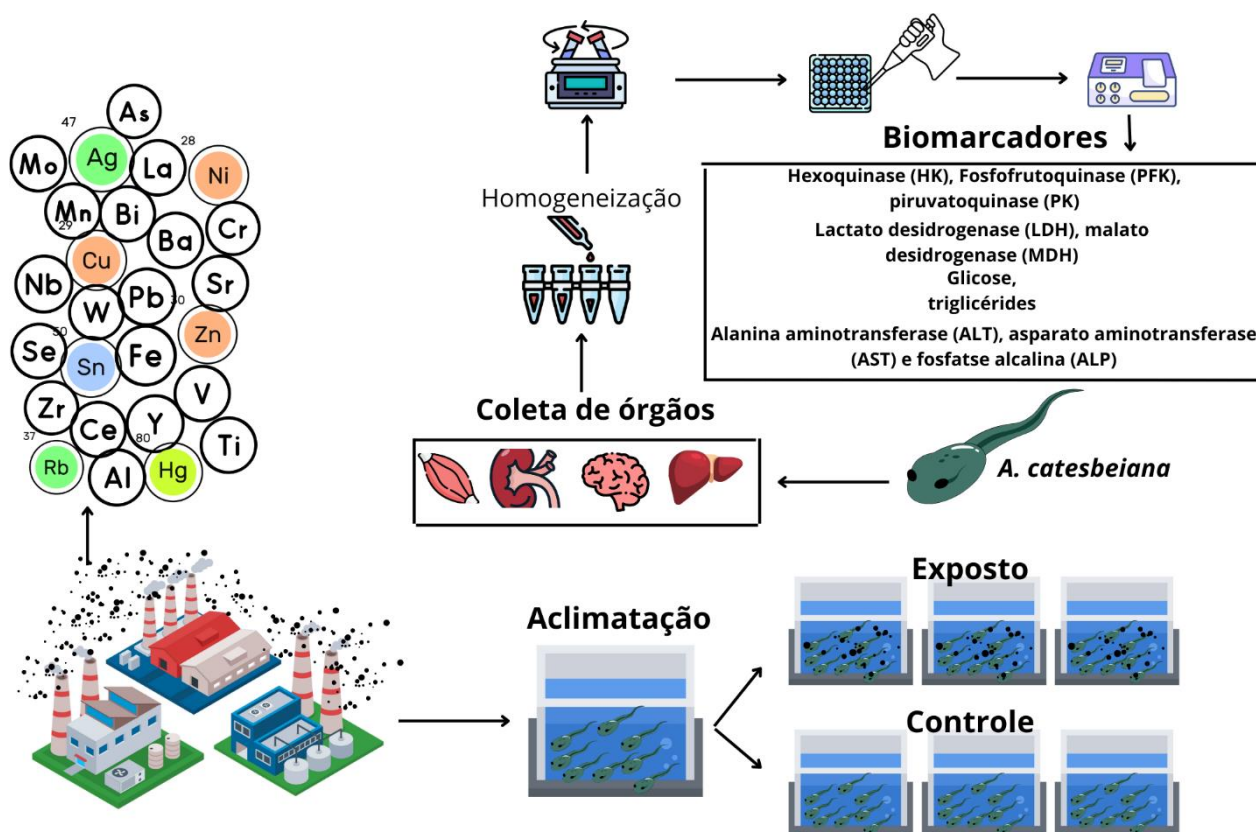
- Soares, M.P., De Angelis, C.F., Cardoso, I.L., McKenzie, D.J., Souza, I.C., Wunderlin, D.A., Monferrán, M.V., Fernandes, M.N., Leite, C.A.C., 2022. Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 257, 109330. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330>
- Souza, I.C., Arrivabene, H.P., Craig, C.A., Midwood, A.J., Thornton, B., Matsumoto, S.T., Elliott, M., Wunderlin, D.A., Monferrán, M.V., Fernandes, M.N., 2018. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. *Sci. Total Environ.* 640, 501-511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.302>.
- Souza, I.C., Mendes, V.A.S., Duarte, I.D., Rocha, L.D., Azevedo, V.C., Matsumoto, S.T., Elliott, M., Wunderlin, D.A., Monferrán, M.V., Fernandes, M.N., 2019. Nanoparticle transport and sequestration: intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. *Sci. Total Environ.* 658, 798-808. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.142>.
- Souza, I.D.C., Arrivabene, H.P., Azevedo, V.C., Duarte, I.D., Rocha, L.D., Matsumoto, S.T., Franco, A., Elliott, M., Wunderlin, D.A., Monferrán, M.V., Fernandes, M.N., 2021a. Different trophodynamics between two proximate estuaries with differing degrees of pollution. *Sci. Total Environ.* 770, 144651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144651>.
- Souza, I.C., Morozeskm M., Mansano, A.S., Mendes, V.A.S., Azevedo, V.C., Matsumoto, S.T., Elliott, M., Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A., Fernandes, M.N., 2021b. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 753, 141976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141976>
- Schleicher, N.J., Weiss, D.J., 2023. Identification of atmospheric particulate matter derived from coal and biomass burning and from non-exhaust traffic emissions using zinc isotope signatures. *Environ. Poll.* 329, 121664. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121664>

- Ullah, S., Li, Z., Hassan, S., Ahmad, S., Guo, X., Wanghe, K., Nabi, G., 2021. Heavy metals bioaccumulation and subsequent multiple biomarkers based appraisal of toxicity in the critically endangered *Tor putitora*, Ecotoxicol. Environ. Saf. 228, 113032. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113032>
- Utsunomiya, H.S.M., Ferraz, J.V.C., Fujiwara, G.H., Gutierrez, D.M., Fernandes, I.F., de Lacerda Valverde, B.S., de Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Fernandes, M.N., Dos Santos Carvalho, C., 2022. Changes in blood parameters and metabolism in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, (Shaw, 1802) after exposure to the Sorocaba River (São Paulo, Brazil) water. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 30 (12), 33419-33431. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24590-5>.
- Van Den Hurk, P., Faisal, M., Roberts, J.R. M.H., 2000. Interactive effects of cadmium and benzo[a]pyrene on metallothionein induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). Mar. Environ. Res. 50 (1-5), 83-87. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00098-2).
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13 (2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Veronez, A.C.S., Salla, R.V., Baroni, V.D., Barcarolli, I.F., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., Chippari-Gomes, A.R., 2016. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Aquat. Toxicol. 174, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.011>
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar. Environ. Res. 44 (1), 69-84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1).
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, F., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. Chemosphere 76, 1416-1427. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.005>

- Wei, L., Ding, G., Guo, S., Tong, M., Chen, W., Flanders, J., Shao, W., Lin, Z., 2015. Toxic effects of three heavy metallic ions on *Rana zhenhaiensis* tadpoles. *Asian Herpetol. Res.* 6(2), 132-142. <https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.140092>
- Wilson, K., Walker, J., 2018. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Eighth edition. Cambridge University Press: New York. <https://doi.org/10.1017/9781316677056>
- Woo, S., Yum, S., Park, H.S., Lee, T.K., Ryu, J.C., 2009. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149 (3), 289-299. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.002>
- Wu, L., Taylor, M.P., Handley, H.K., 2017. Remobilisation of industrial lead depositions in ash during Australian wildfires. *Sci. Total Environ.* 599-600, 1233-1240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.044>.
- Zheng, R., Wang, P., Cao, B., Wu, M., Li, X., Wang, H., Chai, L., 2021. Intestinal response characteristic and potential microbial dysbiosis in digestive tract of *Bufo gargarizans* after exposure to cadmium and lead, alone or combined. *Chemosphere* 271, 129511. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129511>
- Zhu, Q.H., Zhou, Z.K., Tu, D.D., Zhou, Y.L., Wang, C., Liu, Z.P., Gu, W.B., Chen, Y.Y., Shu, M.A., 2018. Effect of cadmium exposure on hepatopancreas and gills of the estuary mud crab (*Scylla paramamosain*): histopathological changes and expression characterization of stress response genes. *Aquat. Toxicol.* 195, 1-7. [https://doi: 10.1016/j.aquatox.2017.11.020](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.020)

Capítulo II

Exposição ao material particulado atmosférico sedimentável: efeitos no metabolismo de girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802).



Resumo: O material particulado atmosférico (MPA) faz parte da composição liberada por indústrias siderúrgicas, esse material tem uma composição complexa contendo metais, essenciais e os descritos como emergentes. O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos metabólicos nos girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, nos órgãos: fígado, músculo, rim e cérebro quando expostos ao Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPA-Se). Os girinos foram expostos ao MPA-Se (1 g L^{-1} , 96h) e seus órgãos foram coletados para análises bioquímicas. Os resultados mostraram um aumento (508-1076%) na atividade das enzimas fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) no fígado, aumento (61%) da hexoquinase (HK) no músculo e diminuição (70%) da PK. A atividade da malato desidrogenase (MDH) diminuiu (43%) no músculo em relação ao grupo controle, enquanto no cérebro houve aumento (245%), na atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi observado uma diminuição (55%) em relação ao grupo controle. Em relação aos metabólitos, a proteína não se obteve alterações, mas os triglicerídeos diminuíram (53% e 64,57%) no fígado e cérebro, em contra partida apresentou um aumento (40%) no músculo, onde a glicose apresentou um aumento (1215%) no cérebro. As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) apresentaram aumento de 100% e 20%, respectivamente no músculo em relação ao controle. A atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) se mostrou alterada apenas no cérebro, com diminuição de 34%. Os metais como: ferro (Fe), alumínio (Al), níquel (Ni), cobre (Cu), manganês (Mn), vanádio (V), bário (Ba), estrôncio (Sr), presentes no MPA-Se, foram absorvidos pelos girinos e induziram estresse oxidativo prejudicando a homeostase fisiológica dos animais devido ao aumento da produção de radicais, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Sendo assim, os resultados obtidos contribuem para a conhecimento dos efeitos negativos do MPA-Se e seus componentes no metabolismo dos girinos, podendo acarretar um prejuízo no seu desenvolvimento, devido a demanda de energia e estresse oxidativo pela presença de metais comprometendo o processo de metamorfose.

Palavras chaves: anfíbios, metais, biomarcadores, energia, estresse oxidativo

1. Introdução

A qualidade dos recursos hídricos e dos solos é influenciada pelas propriedades do ar, uma vez que poluentes presentes no ar podem ser transportados mediante as precipitações das chuvas (Guo *et al.*, 2003, Schleicher e Weiss, 2023). Estudos sobre a distribuição do material particulado em suspensão na atmosfera relatam sua associação à problemas de saúde com riscos para a população humana, à fauna e também à flora (Chan *et al.*, 2001; Who, 2003; Fajersztajn *et al.*, 2017; Guimarães, 2017; Rajak; Chattopadhyay, 2020). Pesquisadores relatam efeitos da exposição contínua ao material particulado atmosférico (MPA) com diversos danos à saúde, principalmente na via respiratória (Lakei *et al.*, 2016, Pryor *et al.*, 2022). Por outro lado, estudos que demonstrem a toxicidade do material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se) nos animais aquáticos são escassos (Duan *et al.*, 2017, Hartono *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2022), e ainda mais aqueles avaliando os efeitos do MPA-Se e seus danos metabólicos na biota aquática.

A composição do MPA depende da sua localização e origem dos poluentes, mas os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e metais em transição são os maiores componentes (Mendonça, 2013; Silva, 2020; Yang *et al.*, 2020). Os metais presentes no MPA podem induzir estresse oxidativo e, em altas concentrações podem prejudicar a homeostase fisiológica dos animais devido a produção excessiva de radicais (Machado *et al.*, 2009; Tariang *et al.*, 2019; Moniruzzaman *et al.*, 2020). Por exemplo, as enzimas glicolíticas como as hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvatoquinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), que atuam no metabolismo da glicose, foram afetadas em girinos de rã-touro expostos a uma parcela de água coletada do Rio Sorocaba contendo alumínio, cobre, manganês e zinco (Al, Cu, Mn e Zn) (Utsunomiya *et al.*, 2022). O excesso de metal no organismo pode gerar radicais como hidroxil e ânion superóxido e levar a ruptura nos tecidos e prejudicar a atividade destas enzimas (Moniruzzaman *et al.*, 2020). O estudo de Harun *et al.* (2022), utilizando a modelagem de proteínas com ligação de sítios ativos por metais, demonstrou que o cádmio (Cd) e o mercúrio (Hg) ligam-se covalentemente nos grupamentos sulfidrila dos resíduos de aminoácidos da cisteína, localizados no sítio alostérico das HK e da PK e, o Hg interage mais com a PK do que o Cd. Os metais essenciais, como Zn, Cu, Mn e ferro (Fe) atuam em várias vias metabólicas modulando etapas regulatórias e, em particular no metabolismo da glicose, influenciando

na sua regulação fisiológica (Sun et al., 2023). Portanto, alterações na atividade de enzimas do metabolismo e nos níveis de metabólitos podem refletir o estado fisiológico do organismo na presença de metais (Carvalho *et al.*, 2008; Abdel-Tawwab; Wafeek, 2017; Moniruzzaman *et al.*, 2020; Utsunomiya *et al.*, 2022).

Da mesma forma que o metais presentes no MPA podem induzir ao estresse oxidativo e na funcionalidade das enzimas da via glicolítica, alguns estudos demonstram que os metais Cd, cromo (Cr), Cu, chumbo (Pb), Zn, Mn, Hg, podem afetar a atividade das aminotransferases (ALT, AST e ALP), gerando um impacto tecidual e perdendo a integridade funcional do órgão analisado. Estudos realizados com peixes e anfíbios, com esses elementos metálicos de forma solo ou combinados entre si, bem como outros tipos xenobióticos (Jayawardena *et al.*, 2017; El-Bouhy *et al.*, 2021; Banaee *et al.*, 2023; Kumar et al., 2023).

Os girinos de rã-touro são exemplos de bioindicadores pela sua capacidade adaptativa, sendo sensíveis a mudanças ambientais e assim sendo usados para avaliar a qualidade do meio ambiente, e fácil manutenção em laboratório, além do tamanho adequado para análises ecotoxicológicas (Hayes *et al.*, 2010, Ossana *et al.*, 2013, Paetow *et al.*, 2013, Veronez *et al.*, 2016, Fernandes *et al.*, 2021, Utsunomiya *et al.*, 2022). O uso destes animais evita a utilização de organismos nativos, que muitas vezes estão em risco de extinção, mas que merecem proteção assim como outras espécies de animais.

Dessa forma, devido às características desta espécie e, aliado à escassez de estudos sobre os efeitos do MPA em anfíbios, pode-se levantar as hipóteses de que os metais presentes no MPA-*Se* vão se acumular de forma diferenciada nos órgãos (fígado, músculo, rim e cérebro) e alterar a atividade das enzimas e metabólitos envolvidas no metabolismo de girinos de rãs-touro, *A. catesbeiana*. Visto que MPA-*Se* é um contaminante com metais emergentes e há poucos estudos que relacionam ele com os biomarcadores de metabolismo. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar como a exposição aguda de MPA-*Se* (96h, 1 g L⁻¹) e a absorção dos metais afetam as enzimas relacionadas à produção de energia, estresse oxidativo e os níveis dos metabólitos em girinos de rã-touro, *A. catesbeiana*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção do Material particulado atmosférico (MPA)

O MPA foi coletado na Ilha do Boi, município de Vitória, estado do Espírito Santo (ES), Brasil (20°18'32"S, 40°16'33"O). Essa região possui um complexo metalúrgico com pelotização de minério de ferro, exportação de ferro, siderurgia e exportação de aço, sendo o Brasil o segundo polo exportador de ferro do mundo (Andrade *et al.*, 1995). Estudos relatam que essa região tem grande impacto (aproximadamente 70%) na emissão de material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se), por meio do Complexo de Tubarão devido à indústria siderúrgica (Santos *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2020; Galvão *et al.*, 2022).

Este capítulo dá sequência ao estudo de Fernandes *et al.* (2024) sobre os efeitos do MPA-Se em girinos de rãs-touro, complementando a proposta inicial da tese.

2.2. Animal

Girinos de rã-touro, *A. catesbeiana*, (N=120) foram obtidos da Fazenda RANAMAT, localizada em Matão-SP (21°39'03,18" S e 48°23'12,61" W). Os animais foram transportados em sacos plásticos de 80 L para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (DCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

No laboratório os animais foram mantidos em tanques de 500 L (N = 120) durante 7 dias para aclimação e para atingir o estágio 25 de Gosner. Os testes foram realizados em triplicata e compreenderam um grupo controle, livre de MPA-Se, e um grupo exposto a 1 g.L⁻¹ de MPA-Se. Os experimentos foram conduzidos em aquários de 200 L, contendo 40 animais por aquário, em sistema estático durante 96 h e protegidos de perturbações externas. A temperatura da água dos tanques (25 ± 1 °C), a aeração constante (> 6,0 mg O₂⁻¹L) e o fotoperíodo natural (aproximadamente 12h claro;12h escuro) foram controlados. Os parâmetros físicos e químicos da solução-teste, foram monitorados diariamente e medidos no início e no final do ensaio (após 96 h) e, não apresentaram variação significativa do início ao final do ensaio. Concluído o período de exposição, os animais foram eutanasiados com benzocaína 0,01%. Em seguida, foram descerebrados para coleta dos órgãos para análise do MPA-Se e análises bioquímicas, neste caso os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela American Society for Testing and Materials (ASTM, 2000) e aprovada pela CEUA nº 4046210222 em 07/03/2022.

2.3. Determinação do metal na água e no tecido

Para análise de metais na água foram coletados 5 ml de água do grupo controle e 5 ml de água do grupo exposto (n=3 por grupo) passando pela acidificação em ácido nítrico (razão 2%) e posterior filtragem em filtro de nitrocelulose. As amostras foram acondicionadas ao final dessas etapas em criotubos e mantidas a 4 °C, até a análise em espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Agilent 7500cx, EUA).

Amostras individuais de tecidos moles foram utilizadas (n=3 animais por grupo) para determinação de concentração de metais/metaloídes nos órgãos de girinos de **rã-touro**, fígado, rim, músculo e cérebro, após a realização da digestão ácida (Berghof speedwave XPERT, Alemanha) como foi descrito por Fernandes *et al.*, 2024.

O fator de bioconcentração (FBC) dos metais em cada órgão analisado, foi calculado com os resultados obtidos nas análises, com base na fórmula: FBC = concentração média do metal no tecido ($\mu\text{g g}^{-1}$)/concentração média do metal na água de exposição ($\mu\text{g L}^{-1}$).

2.4. Preparação de amostra para análise bioquímica

A homogeneização do fígado, rim, músculo e cérebro foi realizada individualmente com tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato, contendo 1,365 M NaCl, 0,027 M KCl, 0,054 M Na₂HPO₄ (7H₂O) e 0,018 M KH₂PO₄), pH 7,2, usando um homogeneizador ultra turrax IKA 10[®]. Posteriormente, o homogenado foi centrifugado (HERMLE Z 323 K) a 12.000g por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante foi separado em alíquotas (em tubos ou placas), que foram congeladas a -80 °C para as análises bioquímicas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A concentração de proteína (pt, mg mL⁻¹) foi realizada conforme descrito por Bradford (1976) utilizando a albumina de soro bovino como padrão em 595 nm. A atividade da hexoquinase (HK) foi determinada de acordo com o descrito por Uyeda e Racker (1965) tendo a reação iniciada com a adição de NADP⁺ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato); a atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada seguindo o descrito por Layzer *et al.* (1969) com início da reação por adição de adenosina trifosfato (ATP); a atividade da piruvatoquinase (PK) foi determinada seguindo o descrito por Bucher e Pfeleiderer (1955) com início da reação por adição do adenosina difosfato (ADP);

atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada como descrito por Bergmeyer (1974) com início da reação por adição $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida); a atividade da malato desidrogenase (MDH) foi determinada como descrito por Childress e Somero (1979) com início da reação por adição de $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida).

O cálculo da atividade das enzimas, HK, PFK, PK, LDH e MDH foi feito a partir da variação da absorbância a 340 nm, dividido pelo coeficiente de extinção (ϵ) do NADH ($6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e pela concentração de proteínas, sendo o resultado expresso por U/mg pt^{-1} .

A quantificação de glicose e triglicérides foi realizada pelo método colorimétrico da Labtest, referências 133 e 87, respectivamente. As aminotransferases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), foram determinadas seguindo o método da Labtest, referências 1008 e 109, respectivamente e a fosfatase alcalina (ALP) por meio do kit da Labtest referência 79. As metodologias seguiram a orientação do fabricante com algumas modificações para adaptação em leitora de microplaca.

2.5. Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os testes Kolmogorov-Smirnov e F foram utilizados para avaliar a normalidade das amostras e a homogeneidade das variâncias, respectivamente. Para comparações entre os grupos, testes t (paramétricos) ou testes U de Mann-Whitney (não paramétricos) e análise de variância (ANOVA) de uma via foram usados com valores de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados usando SigmaStat 3.5 para Windows (Copyright © 2006, Systat Software, Inc.).

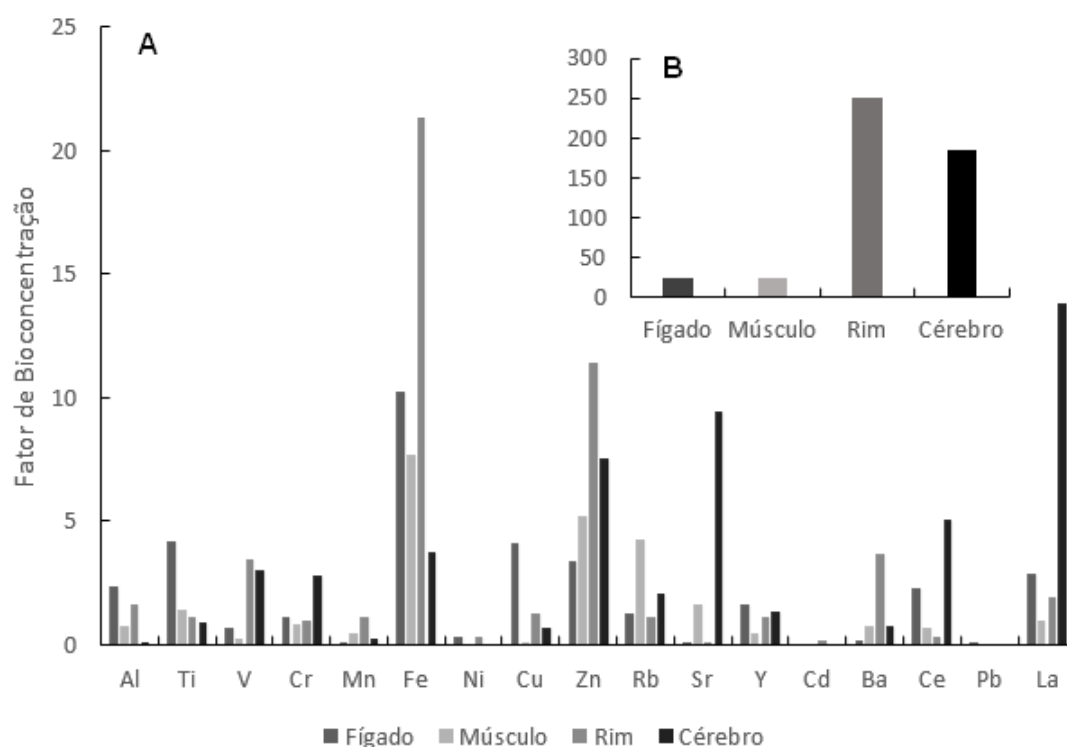
3. Resultados e discussão

Nos girinos expostos ao MPA-Se os seguintes metais/metalóides foram detectados: ítrio (Y), bário (Ba), lantânio (La), zircônio (Zr), níquel (Ni), vanádio (V), Pb, estrôncio (Sr), selênio (Se), titânio (Ti), Cu, Al, Fe^{56} , cério (Ce), Mn, rubídio (Rb), estanho (Sn), tungstênio (W), molibdênio (Mo), Hg^{202} , nos diferentes órgãos e em diferentes proporções, com destaque aos elementos: Y, La, Ce e Ba, considerados contaminantes metálicos emergentes (Tabela 1- Material Suplementar). O fígado e o

músculo foram os órgãos que mais acumularam metais (Y, Ba, La, Zr, Ni, V, Pb, Sr, Se, Ti, Cu, Al), o fígado, por ser um órgão de desintoxicação e o músculo pode ser explicado pela intensa atividade metabólica devido ao processo de metamorfose em que se encontra o animal. Além da detecção dos metais no material particulado, esses elementos metálicos também foram encontrados na água de exposição, mostrando uma grande gama de metais detectados, como exemplo, Cd, Cu e Pb que têm suas concentrações acima do permitido em legislações brasileiras, para águas de classe II. Enquanto nos órgãos dos girinos foram identificados metais como: Cu, Mn, Ba, La, Sr, mostrando um aumento de suas concentrações quando comparados com o grupo controle.

O fator de bioconcentração demonstrou que o estanho foi o metal que mais bioacumulou em todos os órgãos, seguindo a ordem: Rim (250,57) > Cérebro (184,83) > Fígado (24,40) > Músculo (22,42). Além disso, o Fe (F=10,24; M=7,73; R=21,31 e C=3,74) e o Zn (F=3,37; M=5,24; R=13,94; C=7,55) também apresentaram um alto valor de bioconcentração, embora em menores proporções quando comparados ao Sn, sendo o rim o órgão que mais bioacumulou (Figura 1).

Figura 1. Fator de Bioconcentração (FBC) - nos órgãos de *A. catesbeiana* expostas por 96h à 1 g/L de MPA Se. A. Fator de bioconcentração dos metais encontrados nos órgãos e na água e B. Fator de bioconcentração do estanho (Sn). Os valores encontrados foram obtidos através da taxa da concentração de metais nos órgãos ($\mu\text{g/g}$) e da concentração de metais na água ($\mu\text{g/L}$).



O Fe, um dos elementos detectados, é utilizado na produção, armazenamento e estocagem do minério de ferro na região onde foi coletado o MPA (Souza *et al.*, 2021a;

A exposição dos girinos ao MPA-Se provocou aumento da atividade da PK (12 vezes) no fígado e aumento da atividade enzimática da HK (61%) e da PFK (6 vezes) e diminuição (70%) da PK no músculo, além de alterações nas atividades de LDH e MDH no cérebro. O aumento destas enzimas sugere uma demanda de energia pela via aeróbia devido ao estresse oxidativo e processos de desintoxicação pela presença dos metais, que se apresentaram concentrações altas para cada órgão. De fato, Fernandes *et al.* (2024) (Artigo 1) descreveram estresse oxidativo no fígado, músculo, rim e cérebro, devido a presença de diversos metais detectados no MPA-Se e nos tecidos analisados.

Mesmo que os metais não apresentem efeito letal imediato, ao longo do tempo eles bioacumulam nos indivíduos, assim como na cadeia trófica, e podem interferir em processos bioquímicos e fisiológicos (Peltzer *et al.*, 2013; Noman *et al.*, 2022). Utsunomiya *et al.* (2022) estudando os efeitos da exposição de girinos de rã-touro à água do Rio Sorocaba (SP), verificaram aumento da atividade da PFK hepática no verão, corroborando com os resultados aqui obtidos, visto que havia concentração de metais na água analisada. Essa atividade aumentada indica uma demanda maior de ATP devido a exposição ao MPA-Se (Nelson; Cox, 2011; Chagas *et al.*, 2020), mostrando o efeito deletério dos metais nesses animais.

Guo *et al.*, (2016) demonstraram em ratos expostos a monocrotalina, alcaloide pirrolizidinico encontrado em plantas do gênero *Crotalaria*, indução de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e inibição da atividade da PK no soro, resultando em diminuição na produção de energia apesar do aumento da fosforilação. A análise de PK foi realizada juntamente com a análise da LDH no extrato celular e soro do animal. A PK, enzima regulatória da via glicolítica, está ligada a produção de energia (ATP) com formação de piruvato e uma mudança na sua funcionalidade, sendo ela uma diminuição, pode acarretar em dificuldade no processo de metamorfose, pois há uma demanda de energia nesse processo. Ou então, um aumento dessa atividade pode indicar uma produção de energia em excesso, a fim de equilibrar ou mobilizar energia para outras atividades. Importante

ressaltar que o fígado é o órgão principal da regulação do metabolismo de vários nutrientes, como proteína, carboidrato e lipídios, pois contém as enzimas de diferentes vias metabólicas que são ativadas ou desativadas de acordo com a disponibilidade de nutrientes (Romanova *et al.*, 2021). Sendo assim, correlacionando com os resultados apresentados no artigo 1, onde o fígado apresentou concentrações de metais como Y, Ba, La, Zr, Ni, V, Pb, Sr, Se, Ti, Cu e Al (Fernandes *et al.*, 2024), é possível indicar um dano metabólico no fígado devido à alta concentração de metais neste órgão, seguido pelo músculo, onde identificou-se o aumento das concentrações de Fe, Ce, Sr, La, Mn, Al, Se, Ti, Cr, Ba, Rb, Ni, V, Cu, Sn, Zr e Y ocasionando o estresse metabólico. Enquanto o rim, com a sua função de excreção, indicou um aumento de Ba, Hg, Mn e Cu, já o cérebro apresentou um aumento nas concentrações de Ba, Sr, Mo, Fe, Cu, Cr, Mn, W, La, Ce e Y, é possível notar que o Ba é um dos elementos comuns entre todos os órgãos, enquanto elementos como, La e Y foram encontrados no fígado, músculo e cérebro, já Mn e Cu foram identificados no músculo, rim e cérebro.

A LDH apresentou diferença no cérebro, tendo uma diminuição de sua atividade (55%), enquanto nos demais órgãos não houve alteração na sua atividade, Santos *et al.* (2013) obtiveram resultados semelhantes, com uma diminuição na atividade da LDH em girinos de *Pelophylax perezii* expostos a concentrações de Cu, NaCl ou combinados entre si, corroborando com as respostas obtidas aqui. Ademais estudos como de Glavaš *et al.* (2022) que expuseram embriões de *Rana dalmatina* à nanocobre e cobre a granel, demonstraram um efeito negativo na atividade da LDH e no conteúdo de carboidratos, já Salvaterra *et al.* (2013), expuseram girinos de *Pelophylax perezii* à diferentes tamanhos de nanopartículas de silicato de titânio e indicaram uma diminuição na atividade da LDH, destacando que a alteração na atividade da LDH interfere na produção de energia. Dai *et al.* (2009) utilizou a tilápia, *Oreochromis niloticus* para a exposição a variadas concentrações de chumbo, demonstrando diminuição enzimática da LDH, já o estudo de Pinto-Vidal *et al.*, (2021) expôs girinos de rã-touro ao selênio e lítio. Os autores verificaram uma diminuição na atividade da LDH e mobilização de glicose e triglicerídeos no músculo, a fim de manter a demanda de energia na propulsão para a natação destes indivíduos.

Já a MDH diminuiu (43%) no músculo e aumentou (245%) no cérebro de girinos (Figura 1), demonstrando um efeito maior dos metais sobre o metabolismo do músculo e do cérebro. Estes resultados podem ser correlacionados à diminuição da PK e sugerindo

uma redução, ou até mesmo uma inibição da via aeróbia comprometendo o metabolismo com efeitos no desenvolvimento destes animais, em relação ao tamanho e à metamorfose. Contrariamente, Chagas *et al.* (2020), verificaram aumento na atividade da MDH no fígado de girinos de rã-touro expostos aos Zn, Zn+Cu e Cu+Cd, em 2 e 16 dias de exposição. A MDH catalisa a interconversão de malato e oxaloacetato com redução concomitante de NAD^+ ou oxidação de NADH, esta enzima pode atuar tanto em condições aeróbias (malato-oxalacetato) como anaeróbias (oxalacetato-malato) (Ribeiro *et al.*, 2015), bem como na lipogênese e na gliconeogênese (Almeida *et al.*, 2016; Chagas *et al.*, 2020).

O estudo de Don Xavier *et al.* (2018), com peixes *Etroplus suratensis* expostos ao zinco e cobre corroboram com a diminuição da atividade da MDH apresentada no músculo exposto pelo MPA-Se, demonstrando um comprometimento do metabolismo, visto que a MDH é um indicador da respiração aeróbia, podendo indicar uma situação de hipóxia, causada pela exposição a metais.

Figura 2. Atividade enzimática da hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvatoquinase (PK), lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) em fígado, músculo, rim e cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana*, do controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se). Os valores são expressos como média D.P.M. (Desvio Padrão da Média). (n = 6-8). * P < 0,05.

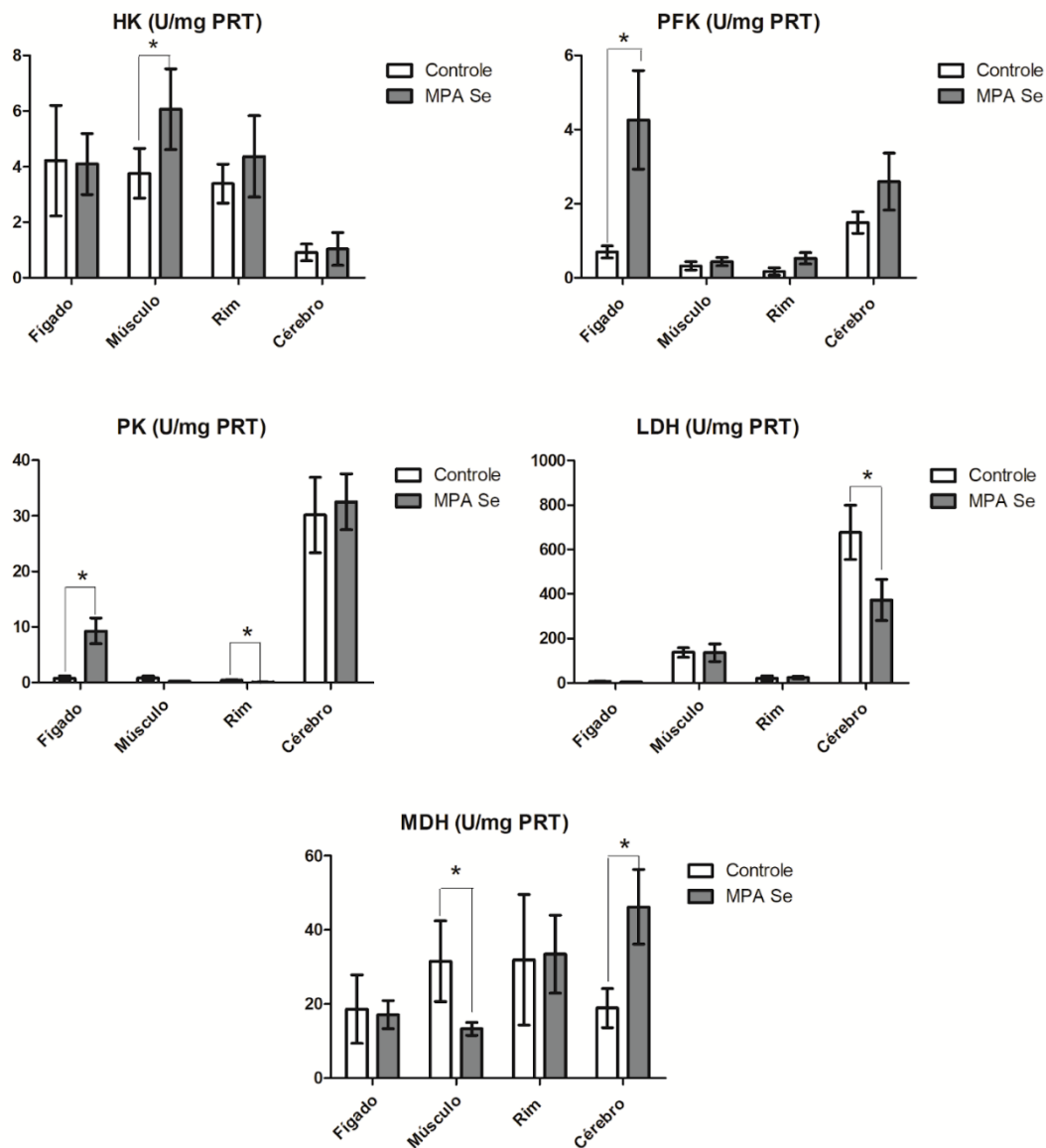


Tabela 1 – Concentração de metabólitos: Glicose e Triglicerídeos (mg dL^{-1}); Proteínas (mg pt L^{-1}) em fígado, músculo, rim e cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana*, do controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA-Se). Os valores são expressos como média D.P.M. (Desvio Padrão da Média). (n = 6-8). * P < 0,05.

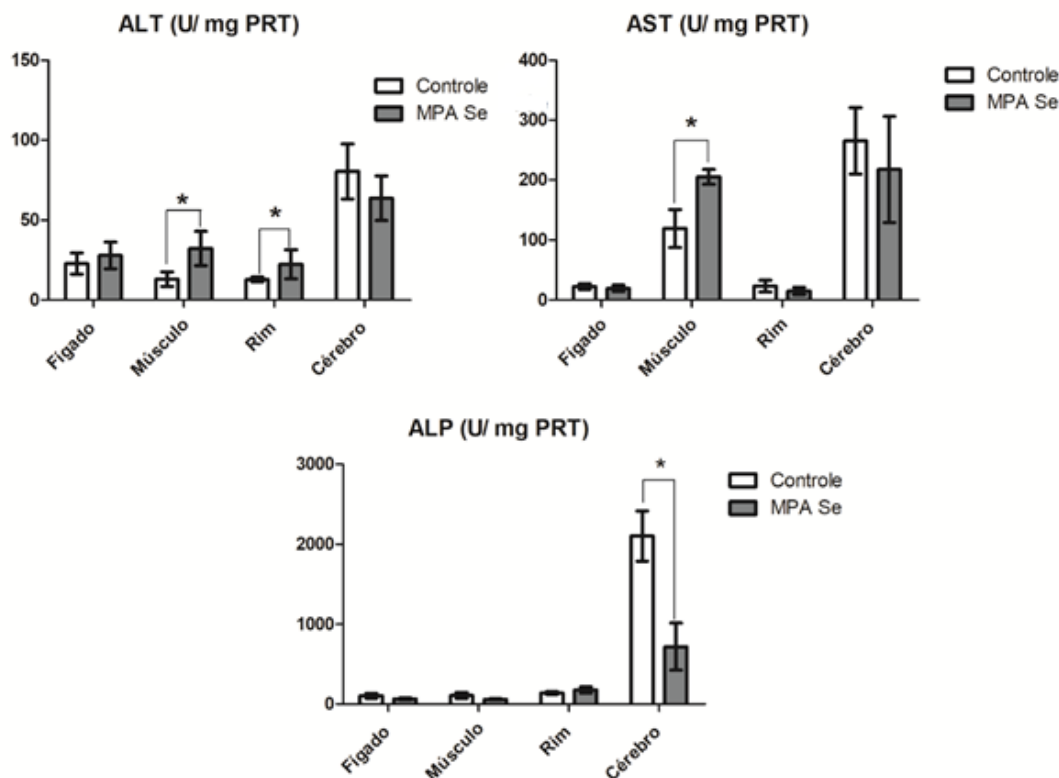
Órgãos	Biomarcadores			
		Proteína	Glicose	Triglicerídeos
Fígado	Controle	16,12 ± 1,67	2,28 ± 0,44	1,97 ± 0,43
	MPA-Se	17,38 ± 1,36	2,28 ± 0,45	0,92 ± 0,17 (↓53,3%)
Músculo	Controle	13,33 ± 1,87	0,69 ± 0,09	0,29 ± 0,06
	MPA-Se	14,49 ± 2,27	0,77 ± 0,05	0,41 ± 0,09 (↑39,59%)
Rim	Controle	6,84 ± 2,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01
	MPA-Se	7,29 ± 2,10	0,03 ± 0,005	0,07 ± 0,01
Cérebro	Controle	9,42 ± 1,54	0,12 ± 0,03	0,72 ± 0,22
	MPA-Se	9,37 ± 1,29	1,62 ± 0,06 (↑1215%)	0,25 ± 0,11 (↓64,57%)

Com relação aos metabólitos (Tabela 1), estes não apresentaram diferenças em relação ao controle, exceto para a glicose no cérebro, que mostrou um aumento de 1215% e os triglicerídeos do músculo, que tiveram um aumento de 39,59%. Este aumento pode estar relacionado à capacidade dos metais em causar mudanças no metabolismo com consequências nos lipídeos da membrana celular (Oner *et al.*, 2008; Lucia *et al.*, 2010; De Moura *et al.*, 2017). Barton (2002) descreve que peixes expostos a metais apresentaram aumento da glicose voltando aos níveis basais após a cessação do estresse metabólico. No fígado e no cérebro dos girinos, a redução de 53,3% e 64,57%, respectivamente, nos níveis dos triglicerídeos nos animais expostos, pode indicar utilização de glicerol e ácidos graxos para manter o nível de glicemia devido a demanda energética na presença de metais/metalóides do MPA-Se (Gondim *et al.*, 2018; Noronha *et al.*, 2022; Caiado, 2024). Esses resultados demonstram também processos bioquímicos e fisiológicos de ajuste, tolerância e enfrentamento ao estresse metabólico em girinos de rã-touro, onde a energia se faz necessária. A manutenção da glicemia é fundamental para o organismo e um dos fatores mais utilizados de respostas fisiológicas em estudos de estresse (Crespi; Denver, 2005).

Estas variações também indicam alta demanda metabólica no fígado pela presença dos metais encontrados no MPA-Se, com utilização das reservas de lipídeos associadas

às atividades da PFK e PK. Enquanto no músculo, provavelmente, o aumento deste metabólito indica estoque de energia para suprir as necessidades metabólicas em situação de exaustão induzida pelos metais e pelo processo de metamorfose do animal. O que pode ser corroborado pelo aumento da HK (mobilização de glicose), diminuição da PK e da MDH (diminuição da via aeróbia). O aumento de triglicerídeos indica também lipogênese e como consequência aumento da atividade das enzimas envolvidas nesta via e aumento do consumo de NADPH, a qual é usada na síntese de lipídeos (Shimeno, 1993; Reddy, Hashimoto, 2001; Fávero *et al.*, 2018). Como descrito por Gashkina *et al.* (2024) os mecanismos fisiológicos, na presença de metais, levam ao aumento de energia com preferência ao metabolismo anaeróbico em peixes, assim, pode-se supor que o mesmo está acontecendo nos girinos.

Figura 3. Atividade enzimática das aminotransferases: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) em fígado, músculo, rim e cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana*, do controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentável (MPA Se). Os valores são expressos como média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). (n = 6-8). * P < 0,05.



No fígado e no rim não foi observado alteração significativa na atividade das enzimas ALT, AST e ALP. Entretanto, no músculo dos girinos expostos ao MPA-Se as ALT e AST aumentaram (100% e 20%, respectivamente) e no cérebro a ALP diminuiu 34 % (Figura 2). As enzimas AST e ALT estão envolvidas no metabolismo dos aminoácidos e, indiretamente podem ter efeitos também no metabolismo das proteínas e dos carboidratos. A AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT), catalisa a transaminação reversível de aspartato e 2-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato. Enquanto a ALT, ou glutamato-piruvato transaminase (GPT), catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Estas enzimas estão principalmente ligadas ao fígado e têm um papel fundamental no metabolismo da glicose e na desintoxicação de radicais (Kumar *et al.*, 2018). Nossos resultados indicam que estas enzimas foram mais susceptíveis tanto no músculo como no cérebro. O aumento na atividade destas enzimas no músculo pode indicar danos no tecido devido ao estresse oxidativo provocado pela presença de contaminantes no ambiente

(Prashanth; Neelagund, 2008; Loteste *et al.* 2013; Attademo *et al.*, 2021). A ALP é uma enzima tida como um importante biomarcador para doenças hepáticas, e a mudança da sua atividade está relacionada com o tipo de patologia relacionada. Ela se origina principalmente do tecido ósseo e do fígado, e níveis aumentados desse biomarcador no plasma sanguíneo podem estar relacionados a doenças hepáticas e/ou óssea (Zierk *et al.*, 2017; Heinrich *et al.*, 2018).

Alguns estudos demonstraram a diminuição da atividade da ALP assim como apresentado nos resultados obtidos, como Singh e Singh (2005) que expuseram peixes, *Channa marulius*, a plantas nativas indianas e a atividade dessa enzima se mostrou diminuída no tecido nervoso, com efeitos na síntese de proteínas e enzimas (Sumner, 1959; Yadaw, 2001). Enquanto Matouke *et al.* (2021) expuseram *Clarias gariepinus* ao cobre e nanopartículas de dióxido de titânio, de forma isolada e combinada, que apresentaram diminuição na atividade da ALP, quando comparada ao grupo controle, demonstrando prejuízos no transporte de metabólitos e na hidrólise de fosfato (Ujjawal *et al.*, 2014).

Estudos sobre os efeitos de metais sobre a atividade dessas enzimas ainda são poucos tanto em peixes como em girinos. Destacam-se os estudos de Kumar *et al.* (2018) sobre efeitos de contaminantes no peixe, *Pangasius hypophthalmus* expostos a altas concentrações de Se (4,5 a 6,0 mg/L) e Se-NPs (2,5 a 4,0 mg/L) mostraram alteração na atividade da ALT e AST além de alterações histopatológicas no fígado e brânquias e de Peltzer *et al.* (2024) em girinos de *Rhinella arenarum* expostos ao Li (2,5 a 20 mg/L, 7 a 14 dias) apresentaram aumento da ALT e AST. Utilizando o sapo verde indiano, *Euphlyctis hexadactylus*, Jayawardena *et al.* (2017) verificaram que a exposição ao Cd, Cr, Cu, Pb e Zn alterou de forma elevada as aminotransferases ALT, AST e ALP, indicando lesões hepáticas. Enquanto Kumar *et al.* (2021) demonstraram em peixes, *Pangasianodon hypophthalmus*, aumento destas enzimas no fígado, músculo e rim, tendo diferenças apenas quando relacionados aos grupos de exposição, após exposição ao Mn e nanopartículas de manganês.

Ainda se tratando das aminotransferases alguns estudos com medicamentos apresentam alterações nos níveis normais de atividades dessas enzimas com aumentos consideráveis, como no caso de Sheikhlangi *et al.* (2023) que expuseram carpas (*Cyprinus carpio*) a concentrações de meloxicam (0; 0,1; 1 e 2 mg/L), e apenas a concentração subletal apresentou uma diminuição da atividade da ALP, Orozco-Hernández *et al.* (2023), em *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de fluoxetina (5, 16 e 40

ng/L) apresentaram atividades alteradas de ALT e ALP sugerindo um desenvolvimento de doença hepática no peixe zebra.

Em razão dos resultados obtidos nesse estudo é possível confirmar, a partir das enzimas analisadas, que os girinos estavam sob condições de estresse metabólico com possíveis danos teciduais provocados pela exposição ao MPA-Se, e os metais que neles são constituídos.

4. Conclusão

Os girinos de rã-touro expostos aos MPA-Se apresentaram alterações significativas em enzimas da via metabólica, com efeito na via aeróbia, alterando também os níveis de glicose no cérebro e triglicerídeos no fígado e músculo. As atividades aumentadas das aminotransferases indicam uma mobilização de energia, para compensar a demanda devido a processos de desintoxicação dos metais que foram absorvidos nos órgãos. Esses resultados demonstram que os órgãos analisados dos girinos sofreram impacto pela exposição ao MPA-Se, indicando maior sensibilidade do fígado, do músculo e também do cérebro. A ação deletéria do MPA-Se no metabolismo de anfíbios, pode prejudicar o seu desenvolvimento com efeitos na metamorfose e estudos acerca da composição do MPA-Se e seus impactos ecológicos na comunidade aquática são urgentes.

5. Material Suplementar

Tabela 2 – Concentração de metal nos órgãos de girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, separados em dois grupos (N=3) sendo um controle e outro exposto ao MPA Se (1g L⁻¹). Adaptado de Fernandes *et al.*, 2024.

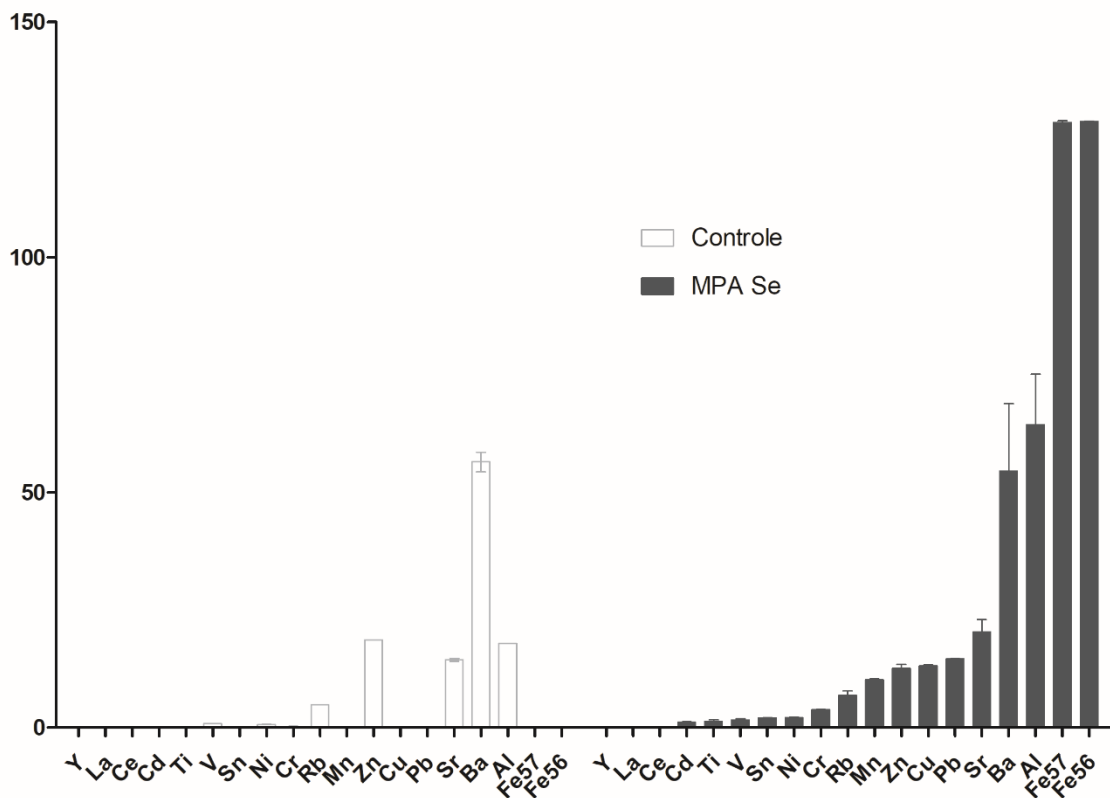
		Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe ₅₆	Fe ₅₇	Ni	Cu	Zn
Fígado	Controle	89,13±0,42	0,55±0,08	0,78±0,07	4,35±1,29	1,65±0,12	1699,37±26,62	2848,87±137,94	0,32±0,11	29,43±0,19	57,04±6,32
	MPA Se	154,73±12,69	5,54±0,61	1,09±0,18	4,25±0,28	1,39±0,11	1320,01±25,60	1349,17±41,14	0,67±0,03	54,07±3,35	42,37±2,15
Músculo	Controle	6,88±0,63	0,49±0,08	0,21±0,04	1,24±0,57	<LOQ	31,67±1,99	33,26±3,44	<LOQ	<LOQ	79,66±12,84
	MPA Se	49,07±3,36	1,85±0,40	0,36±0,08	3,52±0,99	4,48±0,27	996,38±60,35	1018,03±65,55	0,17±0,01	1,45±0,36	65,97±14,56
Rim	Controle	318,64±5,72	11,31±1,02	10,96±0,91	3,79±0,34	3,54±0,08	6820,19±237,31	6985,74±179,31	2,88±0,24	<LOQ	791,20±63,95
	MPA Se	103,81±16,10	1,45±0,65	5,62±0,84	3,90±1,91	11,29±1,67	2745,80±170,79	2753,24±196,65	0,88±0,40	16,46±0,01	175,30±9,26
Cérebro	Controle	60,24±11,63	24,58±3,16	5,18±1,13	8,09±0,26	1,37±0,44	108,15±3,68	189,85±12,88	1,17±0,16	3,65±0,03	251,46±35,08
	MPA Se	5,64±1,33	1,19±0,24	4,92±0,52	10,78±2,33	2,88±0,28	482,42±18,58	516,75±27,19	0,15±0,03	9,09±0,26	95,00±0,083
		As	Se	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Ag	Cd
Fígado	Controle	0,16±0,02	1,95±0,32	10,49±1,69	0,38±0,02	0,04±0,01	<LOQ	<LOQ	0,61±0,08	0,09±0,01	<LOQ
	MPA Se	0,13±0,02	2,58±0,31	8,89±0,81	1,79±0,02	0,1±0,003	0,38±0,07	<LOQ	0,65±0,12	0,09±0,02	<LOQ
Músculo	Controle	<LOQ	0,78±0,08	16,95±0,93	1,62±0,47	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	MPA Se	<LOQ	3,01±0,30	29,69±0,88	32,91±1,38	0,03±0,01	↑0,09±0,03	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Rim	Controle	0,49±0,09	1,02±0,45	11,66±1,02	6,44±0,23	0,29±0,05	2,40±0,07	0,51±0,12	0,56±0,03	0,68±0,06	0,56±0,06
	MPA Se	0,40±0,06	<LOQ	7,84±0,76	3,27±1,29	0,07±0,05	<LOQ	<LOQ	0,19±0,01	0,81±0,17	0,23±0,02
Cérebro	Controle	0,32±0,08	<LOQ	17,12±1,19	15,57±2,83	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,14±0,19	<LOQ
	MPA Se	0,36±0,08	<LOQ	15,12±3,85	200,23±41,45	0,08±0,02	<LOQ	<LOQ	9,02±0,29	0,29±0,04	<LOQ
		Sn	Ba	La	Ce	W	Hg 201	Hg 202	Pb	Bi	
Fígado	Controle	54,97±1,44	1,17±0,43	0,09±0,04	0,47±0,28	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	MPA Se	49,55±11,08	10,11±0,42	0,20±0,01	0,48±0,003	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,27±0,02	<LOQ	
Músculo	Controle	35,36±4,78	18,31±0,53	0,01±0,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	MPA Se	45,53±1,10	41,81±0,21	0,13±0,00	0,25±0,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Rim	Controle	664,20±184,54	99,16±27,43	0,93±0,02	4,99±0,06	0,03±0,00	0,20±0,07	0,17±0,06	4,20±0,07	<LOQ	
	MPA Se	508,66±101,95	199,93±1,31	0,14±0,00	0,07±0,01	0,03±0,00	0,38±0,07	0,35±0,07	<LOQ	<LOQ	
Cérebro	Controle	804,92±167,14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,34±0,08	0,35±0,09	<LOQ	<LOQ	
	MPA Se	375,22±38,82	41,29±0,17	0,97±0,05	1,06±0,01	2,13±0,16	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	

Tabela 3 – Fator de Bioconcentração nos órgãos (fígado, rim, músculo e cérebro) em girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana*, expostos ao MPA Se (1g L⁻¹). Adaptado de Fernandes *et al.*, 2024

Elementos																			
/Órgão	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe ₅₆	Fe ₅₇	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr	Y	Cd	Ba	Ce	Pb	La	Sn
Fígado	2,4	4,19	0,67	1,11	0,13	10,24	10,48	0,31	4,11	3,37	1,28	0,08	1,66	0,01	0,18	2,3	0,08	2,86	24,4
Músculo	0,76	1,4	0,22	0,86	0,44	7,73	7,91	0,05	0,11	5,24	4,29	1,61	0,49	0	0,76	0,72	0,02	1	22,42
Rim	1,61	1,1	3,49	1,02	1,11	21,31	21,4	0,34	1,25	13,94	1,13	0,12	1,15	0,2	3,66	0,32	0,02	1,93	250,57
Cérebro	0,14	0,9	3,05	2,82	0,24	3,74	4,01	0,05	0,69	7,55	2,07	9,42	1,33	0	0,75	5,05	0,01	13,85	184,83

Figura 4. Concentração de metais presentes na água do grupo controle e no grupo exposto ao MPA Se (g L^{-1}). Os valores são expressos em média \pm SE, com $n=3$. Limit of detection (LOD): Al: 0,10; Ti: 0,02; V: 0,05; Cr: 0,05; Mn: 0,38; Fe ^{56,57}: 3,89; Ni: 0,06; Cu: 0,45; Zn: 0,17; As: 0,03; Se: 0,06; Nb: 0,237; Rb: 0,06; Sr: 0,09; Y: 0,003; Zr: 0,03; Nb: 0,15; Mo: 0,15; Ag: 0,02; Cd: 0,04; Sn: 0,07; Ba: 0,15; La: 0,0002; Ce: 0,002; W: 0,007; Hg ^{201,202}: 0,07; Pb: 0,19; Bi: 0,12. Limit of quantification (LOQ): Al: 0,28; Ti: 0,05; V: 0,07; Cr: 0,09; Mn: 0,83; Fe ^{56,57}: 4,59; Ni: 0,10; Cu: 1,09; Zn: 0,48; As: 0,09; Se: 0,15; Rb: 0,08; Sr: 0,22; Y: 0,004; Zr: 0,08; Nb: 0,37; Mo: 0,06; Ag: 0,05; Cd: 0,05; Sn: 0,2; Ba: 0,31; La: 0,0008; Ce: 0,002; W: 0,02; Hg ^{201,202}: 0,07; Pb: 0,45; Bi: 0,28. Adaptado de Fernandes *et al.*, 2024



6. Referências

- Abdel-Tawwab, M.; Wafeek, M. Fluctuations in water temperature affected waterborne cadmium toxicity: Hematology, anaerobic glucose pathway, and oxidative stress status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 2017, 477, 106-111.
- Almeida, M. E.; Batista, M.T.O.; de Oliveira, M.F.; Vani, G.S.; Rodrigues, E.; Suda, C.N.K. Atividade da malato desidrogenase muscular de *Astyanax bimaculatus* da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadora de impacto ambiental. *Revista Ambiente & Água*, 2016, 11, 1096-1108.
- Attademo, A.M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Boccioni, A.P.C.; Martinuzzi, C.; Simoniello, F.; Repetti, M.R. Effects of the emulsifiable herbicide Dicamba on amphibian tadpoles: an underestimated toxicity risk? *Environmental Science and Pollution Research International*. 2021, 24, 31962-31974. <https://doi:10.1007/s11356-021-13000-x>.
- Barton, B.A., Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 2002, 42, 517-525.
- Bergmeyer, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, 1974 Weinheim, Germany
- 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*. 1976, 72, 248-254. [https://doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bucher, T.; Pfeleiderer, G. Pyruvatekinase from muscle. *Meth Enzym*. 1955, 1, 435- 440.
- Caiado, M.S. Efeitos da morfina sobre o metabolismo lipídico de *Aedes aegypti* e seus efeitos na fisiologia reprodutiva. 2024.
- Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 2008. 151: 437-442

- Chagas, B.R.C.; Utsunomiya, H.S.M.; Fernandes, M.N.; Carvalho, C.S. Metabolic responses in bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. *Comparative Biochemistry Physiology C Toxicology & Pharmacology*, 2020. 233:108768. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108768>.
- Chan, L.Y.; Kwok, W.S.; Lee, S.C.; Chan, C.Y. Spatial variation of mass concentration of roadside suspended particulate matter in metropolitan Hong Kong. *Atmospheric Environment*, 2001. 35, 3167-3176
- Childress, J. J.; Somero G.N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, 1979, 52, 273-283.
- Crespi, E.J.; Denver, R.J. Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 2005. 141, 381-390.
- Dai, W.; Fu, L.; Du, H.; Jin, C.; Xu, Z. Changes in growth performance, metabolic enzyme activities, and content of Fe, Cu, and Zn in liver and kidney of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to dietary Pb. *Biological trace element research*, 2009. 128, 176-183.
- De Moura, F.R.; Lima, R.S.; Cunha, A. P. S.; Da Costa Marisco, P.; Aguiar, D. H.; Sugui, M. M.; Sinhorin, A.P.; Sinhorin, V. D. G. Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017. 56, 241-248.
- Don Xavier, N.D.; Nandan, S.B.; Jayachandran, P.R.; Anu, P.R.; Midhun, A.M.; Mohan, D. Chronic effects of copper and zinco n the fish, *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790), by contínuos flow through (CFT) bioassay. *Marine Toxicology*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.002>.
- Duan, J.; Hu, H.; Zhang, Y.; Feng, L.; Shi, Y.; Miller, M.R.; Sun, Z. Multi-organ toxicity induced by fine particulate matter PM2.5 in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Chemosphere*, 2017. 180, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.013>

- Fajersztajn, L.; Saldiva, P.; Pereira, L.A.A., Leite, V.F.; Buehler, A.M. Short-term effects of fine particulate matter pollution on daily health events in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Public Health*, 2017. 62, 729-738.
- Favero, G.C.; Gimbo, R.Y.; Franco Montoya, L.N.; Zanuzzo, F.S.; Urbinati, E.C. Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Research*, 2018. 49, 359–366.
- Fernandes, I.F.; Utsunomiya, H.S.M.; Valverde, B.S.L.; Cassiel Ferraz, J.V.; Fujiwara, G.H.; Gutierrez, D.M.; de Oliveira, C.; Belussi, L.F.; Fernandes, M.N.; Carvalho, C.S. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Chemosphere*, 2021. 275, 130000. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130000>.
- Galvão, E.S.; Santos, J.M.; Reis Junior, N.C.; Feroni, R.S.; Orlando, M.T.D. The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and sources in an industrialized region of southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2022. 194, 88. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09710-x>.
- Gashkina, N.A. Metal Toxicity: Effects on Energy Metabolism in Fish. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. 25(9):5015. <https://doi:10.3390/ijms25095015>.
- Glavas, O.J.; Stjepanovic, N.; Hackenberger, B.K. Influence of nano and bulk copper on agile frog development. *Ecotoxicology*, 2022. 31, 357-365. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02506-2>
- Gondim, K.C.; Atella, G.C.; Pontes, E.G.; Majerowicz, D. Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2018. 101, 108-123. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.08.005>
- Gosner, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 1960, Austin 16, 183-190
- Governo do Estado do Espírito Santo. 2024. Infraestrutura: Transportes - Portos. Disponível em: < www.es.gov.br >

- Guimarães, C. Controle e monitoramento de poluentes atmosféricos. Elsevier Brasil, 2017.
- Guo D.; Gu J.; Jiang H.; Ahmed A.; Zhang Z.; Gu, Y. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2016. 91, 179-87. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.009.
- Guo, H.; Lee, S.C.; Ho, K.F.; Wang, X.M.; Zou, S.C. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, 2003. 37(38), 5307-5317. doi:10.1016/j.atmosenv.2003.09.011
- Hartono, D.; Lioe, B.; Zhang, Y.; Li, B.; Yu, J. Impacts of particulate matter (PM_{2.5}) on the behavior of freshwater snail *Parafossarulus striatulus*. *Scientific Reports*, 2017. 7, 644. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00449-5>.
- Harun, A., Jinan F, S., Setiawan, B., & Komari, N. Interactions of heavy metals on enzymes in carbohydrate metabolism: In silico study on glucokinase and pyruvate kinase. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 2022. 22 (2), 124-128. <http://journal.umy.ac.id/index.php/mm>
- Hayes, T.B.; Falso, P.; Gallipeau, S.; Stice, M. The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 2010. 213 (6), 921–933. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>
- Jayawardena, V.A.; Angunawela, P.; Wickramasinghe, D.D.; Ratnasooriya, W.D.; Udagama, P.V. Heavy metal-induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017. 36, 2855-2867.
- Kumar, N.; Krishnani, K.K.; Singh, N.P. Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018. 25(9): 8914-8927. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1165-x>.
- Kumar, N.; Thorat, S.T.; Reddy, K.S. Multi biomarker approach to assess manganese and manganese nanoparticles toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus*. *Scientific Reports*, 2023.

- Lakey, P.S.J.; Berkemeier, T.; Tong, H.; Arangio, A.M.; Lucas, K.; Poschl, Shiraiwa. M.Chemical exposure-response relationship between air pollutants and reactive oxygen species in the human respiratory tract. *Scientific Reports*, 2016. 6, 32916. <https://doi.org/10.1038/srep32916>
- Lam, P.K.S.; Gray, J.S. The Use of Biomarkers in Environmental Monitoring Programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 2003. 46, 182-186.
- Layzer, R.B.; Rowland, L.P.; Bank, W.J. Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1969. 244:3823-3831.
- Loteste, A.; Scagnetti, J.; Simoniello, M.F.; Campana, M.; Parma, M.J. Hepatic enzymes activity in the fish *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) after sublethal cypermethrin exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013. 90(5): 601-604. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-0961-3>
- Lucia, M.; Aandré, J. M.; Gonzalez, P.; Baudrimont, M.; Bernadet, M. D.; Gontier, K.; Maury-Brachet, R.; Guy, G.; Davail, S. Effect of dietary cadmium on lipid metabolism and storage of aquatic bird *Cairina moschata*. *Ecotoxicology*, 2010. 19, 163.
- Machado, L. P.; Kohayagawa, A.; Saito, M. E.; Silveira, V. F. da; Yonezawa, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 2009, 8(1), 84-94.
- Machado, M.; Reisen, V.A.; Santos, J.M.; Junior, N.C.R.; Frère, S.; Bondon, P.; Ispány, M.; Cotta, H.H.A. Use of multivariate time series techniques to estimate the impact of particulate matter on the perceived annoyance. *Atmospheric Environment*, 2020. 222, 117080. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117080>
- Matouke, M.M; Sanessi, H.M.; Eneajo, A.S. Interaction of copper with titanium dioxide nanoparticles induced hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. 28, 67646-67656.

- Mendonça, R. B. S., 2013. Estudos de Espécies Metálicas Associadas ao MP10 e MP2,5 oriundos de Emissões Veiculares. Ph.D. Thesis, Postgraduate Program in Chemistry at Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, 148 pages.
- Moniruzzaman, M.; Kumar, S.; Das, D.; Sarbajna, A.; Chakraborty, S.B. Enzymatic, non enzymatic antioxidants and glucose metabolism enzymes response differently against metal stress in muscles of three fish species depending on different feeding niche. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020. 202, 110954. <https://doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110954>.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5th Edition. Artmed, 2011, Porto Alegre, 1273.
- Noman, M.A.; Feng, W.; Zhu, G.; Hossain, M.B.; Chen, Y.; Zhang, H.; Sun, J. Bioaccumulation and potential human health risks of metals in commercially important fishes and shellfishes from Hangzhou Bay, China. *Scientific Reports*, 2022. 12, 4634. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08471-y>.
- Noronha, C.M.; Freitas, F.M.N.O.; Ferreira, J.C.S. Nutritional strategies in mitochondrial biogenesis and the performance effects of energy pathways for the Endurance athlete. *Research, Society and Development*, 2022. 11, e57511528837. <https://doi:10.33448/rsd-v11i5.28837>.
- Öner, M.; Atli, G.; Canli, M. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008. 27, 360-366.
- Orozco-Hernández, J.M.; Elizalde-Velázquez, G.A.; Gómez-Oliván, L.M.; Santamaría-González, G.O.; Rosales-Pérez, K.E.; García-Medina, S.; Galar-Martínez, M.; Juan-Reyes, N.S. Acute exposure to fluoxetine leads to oxidative stress and hematological disorder in *Danio rerio* adults. *Science of the total Environment*, 2023. 905, 167391.
- Ossana, N.A.; Castane, P.M.; Saliban, A. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013. 65 (3), 486-497.

- Paetow, L.J.; McLaughlin, J.D.; Pauli, B.D.; Marcogliese, D.J. Mortality of American bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* infected by *Gyrodactylus jennyae* and experimentally exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2013. 25 (1), 15-26.
- Peltzer, M. P.; Lajmanovich, R. C.; Attademo, A. M.; Junges, C. M.; Cabagna-Zenklusen, M. C.; Repetti, M. R.; Sigrist, M. E. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013. 142-151.
- Peltzer, P.M.; Cuzziol Boccioni, A.P.; Attademo, A.M.; Simoniello, M.F.; Lener, G.; Lajmanovich, R.C. Ecotoxicological characterization of lithium as a “Timebomb” in aquatic systems: Tadpoles of the South American Toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) as model organisms. *Toxics* 2024. 12, 176. <https://doi.org/10.3390/toxics12030176>
- Pinto-Vidal, F.A.; Carvalho, C.S.; Abdalla, F.C.; Utsunomiya, H.S.M.; Salla, R.F.; Jones-Costa M. Effects of lithium and selenium in the tail muscle of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) during premetamorphosis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15686-5>
- Prashanth, M.S.; Neelagund, S.E. Impact of Cypermethrin on enzyme activities in the freshwater fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 2008. 6(2): 91-95
- Pryor, J.T.; Cowley, L.O.; Simonds, S.E. The physiological effects of air pollution: particulate matter, physiology and disease. *Frontiers in Public Health*, 2022. 14 (10), 882569. <https://doi:10.3389/fpubh.2022.882569>.
- Rajak, R.; Chattopadhyay, A. Short and long term exposure to ambient air pollution and impact on health in India: a systematic review. *International journal of environmental health research*, 2020. 30, 593-617.

- Reddy, J.K.; Hashimoto, T. Peroxisomal β oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : An Adaptive Metabolic System. *Annual Review of Nutrition*, 2001. 21, 193-230.
- Romanova, E.B.; Ryabinina, E.S.; Boryakov, A.V. Heavy metal accumulation in the tissues and organs of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) and *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) (Amphibia: Ranidae) inhabiting the waterbodies of Nizhny Novgorod. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Science*, 2021. 48, 1862-1869. <https://doi.org/10.1134/S1062359021100228>.
- Salvaterra, T.; Alves, M.G.; Domingues, I.; Pereira, R.; Pasteiro, M.G.; Carvalho, R.A.; Soares, A.M.V.M.; Lopes, I. Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezi* (Seoane). *Aquatic Toxicology*, 2013. 128-129, 190-192. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.014>
- Santos, B.; Ribeiro, R.; Domingues, I.; Pereira, R.; Soares, A.M.V.M.; Lopes, I.; Salinity and copper interactive effects on perezi's frog *Pelophylax perezi*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013. 32, 1864-1872. <https://doi.org/10.1002/etc.2257>
- 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*, 2017. 24 (27), 22026-22039. <https://doi.org/10.1029/2010RG000328>
- Schleicher, N.J.; Weiss, D.J. Identification of atmospheric particulate matter derived from coal and biomass burning and from non-exhaust traffic emissions using zinc isotope signatures. *Environmental Pollution*, 2023. 329, 121664. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121664>
- Shaw, G. *General zoology or systematic natural history*. Volume III, Part 1. Amphibia. 1802, Thomas Davison, London.
- Shimeno, S.; Ming, D.C.; Takeda, M. Metabolic Response to Dietary Carbohydrate to Lipid Ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993. 59, 827-833.

- Scheikhlangi, Z.; Gharaei, A.; Harijani, J.M.; Davari, S.A.; Hassanin, P.; Rahdari, A. Toxicological effects of meloxicam on physiological and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carp*). *Veterinary Medicine and Science*, 2023. 9, 2085-2094.
- Silva, S.N, 2020. Análise de Metais no Material Particulado Atmosférico Fino (MP2,5) na Área Urbana da Cidade de Manaus. Master's Dissertation of the Post-Graduate Program in Climate and Environment of the National Institute for Research of the Amazon, Universidade Estadual do Amazonas, 60 páginas.
- Singh, D.; Singh, A. The toxicity of four native indian plants: Effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. *Chemosphere*, 2005. 60, 135-140.
- Soares, M.P.; De Angelis, C.F.; Cardoso, I.L.; Mckenzie, D.J.; Da Costa Souza, I.; Wunderlin, D.L.A.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M.N.; Leite, C.A.C. Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2022. 257, 109330.
- Souza, I.C.; Morozesk, M.; Mansano, A.S.; Mendes, V.A.S; Azevedo, V.C.; Matsumoto, S.T.; Elliott, M.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 2021. 753, 141976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141976>
- Sumner, A.T. The cytology and histo–chemistry of the digestive gland cells of *Helix*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 1959. 106, 173-192.
- Sun, Z.; Shao, Y.; Yan, K.; Yao, T.; Liu, L.; Sun, F.; Wu, J.; Huang, Y. The Link between trace metal elements and glucose metabolism: Evidence from zinc, copper, iron, and manganese-mediated metabolic regulation. *Metabolites*, 2023. 13, 1048. <https://doi.org/10.3390/metabo13101048>
- Tariang, K.U.; Ramanujam, S.N., Das, B. Effect of arsenic (As) and lead (Pb) on glycogen content and on the activities of selected enzymes involved in carbohydrate

metabolism in freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. International Aquatic Research, 2019. 11, 253-266.

Ujjawal, S.; Deeksha, P.; Rajendra, P. Alkaline phosphatase: an overview. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2014. 29 (3), 269-278.

Utsunomiya, H.S.M.; Ferraz, J.V.C.; Fujiwara, G.H.; Gutierrez, D.M.; Fernandes, I.F.; de Lacerda Valverde, B.S.; de Oliveira, C.; Franco-Belussi, L.; Fernandes, M.N.; Dos Santos Carvalho, C. Changes in blood parameters and metabolism in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, (Shaw, 1802) after exposure to the Sorocaba River (São Paulo, Brazil) water. Environmental Science and Pollution Research Internacional, 2022. 30 (12), 33419-33431. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24590-5>.

Uyeda, K.; Racker, E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism-VII. Hexokinase and phosphofructokinase. Journal of Biological Chemistry, 1965. 24: 4682-4688

Veronez, A.C.S.; Salla, R.V.; Baroni, V.D.; Barcarolli, I.F.; Bianchini, A.; Martinez, C.B.R.; Chippari-Gomes A.R. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Aquatic Toxicology, 2016. 174:101-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.011>

World Health Organization. Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen Dioxide, 2003. 98 p.

Yadav, R.P. Studies on molluscicidal properties of some common plants of family euphorbiaceae and their environmental impact on non-target organism. 2001. Ph.D. thesis DDU Gorakhpur University, Gorakhpur 273009, UP, India.

Yang, H.S.; Sim, H.J.; Cho, H. *et al.* Alpha-tocopherol exerts protective function against the mucotoxicity of particulate matter in amphibian and human goblet cells. Scientific Reports, 2020. 10, 6224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63085-6>

6. Considerações Finais

Neste trabalho expusemos girinos de rã-touro, *A. catesbeiana*, ao MPA-Se (1g L⁻¹) de forma aguda, afim de compreender os efeitos bioquímicos causados. Visto que o MPA, coletado da Ilha do Boi, bairro da cidade de Vitória-ES, está relacionado a siderurgia do Complexo do Tubarão e afeta o ecossistema ali presente.

Como previsto nas hipóteses iniciais, o MPA apresentou altas concentrações de metais, como Fe, Ti e Ba. Além de apresentar concentrações de metais na água em que esses animais foram expostos, mostrando diferenças entre o grupo controle e exposto ao MPA-Se, onde o Fe seguiu apresentando uma maior concentração. Também o Al, Sr, Pb e Cu mostraram valores com significância em relação ao controle, no caso de alguns metais esses valores se encontraram acima do permitido pela resolução CONAMA 357/2005.

Outra hipótese confirmada foi em relação ao acúmulo de metais, presentes no MPA/MPA-Se, nos órgãos analisados, onde o músculo e o fígado foram os que mais apresentaram metais. Os metais, Ce, Sr, Y, Al, Cu, Ti aumentaram quando comparados com o grupo controle, provavelmente devido as funcionalidades desses órgãos, já que o músculo está envolvido no processo de metamorfose, facilitando a captação de metais no ambiente. E o fígado que é capaz de viabilizar a desintoxicação destes elementos, explicando a maior quantidade de metais nesses órgãos. Enquanto o rim foi o órgão que mais bioacumulou, seguido do cérebro, mostrando que apesar das concentrações de metais nesse órgão não terem sido altas, ainda assim quando analisando com o ambiente em que estava ele acaba se destacando, quando analisado o fator de biocontração.

Em relação aos biomarcadores o MPA-Se alterou de forma significativa os associados ao estresse oxidativo e também ao metabolismo. Visto os resultados obtidos de proteínas carbonilas no fígado e cérebro, e as alterações nas atividades enzimáticas, principalmente no fígado e músculo, demonstrando efeitos dos metais/metalóides presentes no MPA/MPA-Se de forma deletéria.

De forma geral este estudo demonstrou os impactos causados pelo MPA-Se em órgãos de girinos de rã-touro, onde sua composição metálica afeta a via metabólica devido a produção de radicais ocasionando o estresse oxidativo. Além disso, a contaminação por

MPA-Se pode comprometer o desenvolvimento adequado dos girinos, impactando na transformação em adultos e também a longo prazo a comunidade toda.

Portanto, é crucial a adoção de medidas para monitoramento e controle da emissão de MPA-Se, afim de proteger o ecossistema. O investimento em tecnologias limpas, políticas ambientais mais rigorosas e educação ambiental são essenciais para mitigar os efeitos nocivos e proteger o ecossistema aquático, de metais potencialmente tóxicos contidos no MPA-Se.

7. Referências

- ABNT. 1991. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12065. Atmosfera Determinação da Taxa de Poeira Sedimentável Total. Rio de Janeiro-RJ.
- Adorno, H. A.; Souza, I. C.; Monferrán, M. V.; Wunderlin, D. A.; Fernandes, M. N.; Monteiro, D. A. 2023. 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*, v. 856, p. 159168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>
- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London, p. 671–684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.X5001-4>.
- Almeida, M E, Batista, M T O, de Oliveira, M F, Vani, G S, Rodrigues, E, Suda, C N K, 2016. Atividade da malato desidrogenase muscular de *Astyanax bimaculatus* da bacia hidrográfica do rio una como biomarcadora de impacto ambiental. *Revista Ambiente & Água* v. 11, p. 1096-1108.
- Alves, A.C. M., Rosa, P. F. R., Aguiar, M. L. 2015. Determinação da concentração de chumbo (Pb) presente no material particulado fino (MP2,5) e grosso (MP10) da região central de Goiânia - Go. *Enciclopédia Biosfera*, v.11 n.21; p. 2563.
- Ancelet, T.; Davy, P.K.; Trompeter, W.J.; Markwitz, A.; Weatherburn, D.C. 2013. Carbonaceous aerosols in a Wood burning community in rural New Zealand. *Atmospheric Pollution Research*, v. 4, p. 245-249.
- Fry, A.E.; Leius, V.K.; Bacher, B.E.; Kaltenbach, J.C. 1973. Histochemical patterns in the tadpole tail during normal and thyroxine-induced metamorphosis: I. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, esterase, and aminopeptidase, *General and Comparative Endocrinology*, v. 21, Issue 1, p. 16-29, [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(73\)90152-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(73)90152-4).
- Anderson, J.O.; Thundiyil, J.G.; Stolbach, A. 2012. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of Medicine Toxicology*, v. 8 (2), p. 166-75. <https://doi:10.1007/s13181-011-0203-1>.

- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J. 2014. Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Molecular Plant Pathology*, v.15(4), p. 406-16. <https://doi:10.1111/mpp.12095>.
- Arrivabene, H. P. et al. 2015. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. *Chemosphere*, v. 127, p. 27-34.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. 2000. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. (E 729-96). In: *Annual Book of Standards*, v. 11.05, Section 11. Philadelphia, PA, p. 220-240.
- Attademo AM, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Boccioni APC, Martinuzzi C, Simoniolo F, Repetti MR. 2021. Effects of the emulsifiable herbicide Dicamba on amphibian tadpoles: an underestimated toxicity risk? *Environmental Science and Pollution Research International*. v. 28(24), p. 31962-31974. <https://doi:10.1007/s11356-021-13000-x>.
- Bakand, S.; Hayes, A.J. 2016. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* v. 17.
- Ballesteros, M. L.; Wunderlin, D. A.; Bistoni, M. A. 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 1, p. 199-205.
- Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. de C. G.; De Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23(4), p. 629–643. <https://doi:10.1590/s1415-52732010000400013>
- Bergmeyer, H.U. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

- Bhattacharai, G., Shrestha, S.K., Sim, H.J., Lee, J.C., Kook, S.H., 2024. Effects of fine particulate matter on bone marrow-conserved hematopoietic and mesenchymal stem cells: a systematic review. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 56, p. 118-128. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01149-z>
- Bícego, K. C.; Barros, R. C. H.; Branco, L. G. S. 2007. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology part A*, v. 147, p. 616–639.
- Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, p. 9-19.
- Boonyatumanond, R. 2006. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 8, p. 942–956.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254. [https://doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braga, L.G.T.; Lima, S.L. 2001. Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na fase de recria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 30, n.6, p. 1659-1663.
- BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, 2011.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 491 de 19 de novembro de 2018. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar. 2018.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº. 001 de 23 de janeiro de 1986. Dispõe sobre os critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental, 1986.

- Brito, P.H.F.; Araújo, R.S.; Silva, G.M.M. 2018. Composição química do material particulado atmosférico: uma revisão de literatura. HOLOS, v 03. <https://doi:10.15628/holos.2018.4648>.
- Bucher, T.; Pfeleiderer, G. 1955. Pyruvatekinase from muscle. Meth Enzym., v.1, p. 435-440.
- Calderón, F. S. Á., Henríquez, V., Pocasangre-Orellana, X., Rivera, J. G. A.; Argueta, E. A. C. 2022. Bioacoustics characterization and habitat use of glass frogs in El Salvador. UNED Research Journal, v. 14(2), p. e4008-e4008.
- Campbell, N. 2004. Diffuse Pollution. An introduction to the problems and solutions. London: IWA Publishing.
- Campbell, M. K., 2006, Bioquímica, 4a ed, São Paulo, Editora ARTEMED.
- Cakmak, S. 2014. Metal composition of fine particulate air pollution and acute changes in cardiorespiratory physiology. Environmental Pollution, v. 189, p. 208-214.
- Carvalho, C.S.; Bernusso, V.A.; Fernandes, M.N. 2015. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). Aquatic Toxicology, v.167, p. 220-227.
- Carvalho, C.S.; Utsunomiya, H.S.M.; Pasquato, T.; Lima, R.; Costa, M.J.; Fernandes, M.N. 2017. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. Environmental Pollution, v. 221, p. 445-452.
- Carvalho, M.M; Lira, V.S; Watanabe, C.H; Fracácio, R. 2017. Estudo da toxicidade de metais (Zn e Cd) sobre *Ceriodaphnia dubia*, por multivias de exposição e recuperação biológica de descendentes. Engenharia Sanitária Ambiental. v. 22. n. 5.
- Catenazzi, A. 2015. Estado dos anfíbios do mundo. Revisão anual de meio ambiente e recursos, v. 40, p. 91-119, 2015

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). Padrões de qualidade do ar. Índices de qualidade do ar. 2021. Disponível em: Padrões de Qualidade do Ar | Qualidade do Ar (cetesb.sp.gov.br). Acesso em: agosto/2023.

Chagas BRC, Utsunomiya HSM, Fernandes MN, Carvalho CS. 2020. Metabolic responses in bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology part C Toxicology & Pharmacology* v. 233, p. 108768. <https://doi:10.1016/j.cbpc.2020.108768>.

Chai, L.; Wang, H.; Deng, H.; Zhao, H.; Wang, W. 2014. Chronic exposure effects of copper on growth, metamorphosis and thyroid gland, liver health in Chinese toad, *Bufo gargarizans* tadpoles, *Chemistry and Ecology*, v. 30:7, p. 589-601, <https://doi.10.1080/02757540.2014.894985>

Chaousis, S.; Leusch, F.; Merwe, J.V. 2017 Charting a path towards non-destructive biomarkers in threatened wildlife: A systematic quantitative literature review. *Environmental Pollution*.

Childress, J.J.; Somero, G.N. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, v. 52, n. 3, p. 273-283.

CODESA. 2018 Companhia Docas do Espírito Santo. Complexo Portuário. In: Porto de Vitória. Disponível em: < <http://www.codesa.gov.br/site/?p=complexo-portuario> >

Colosio, R.R.; Santos, L.F.J.; Gonçalves, A.M.; Santana, C.C.; Pavarina, G.C.; Pizauro, J.M. 2021. Enzymatic activity of bone markers on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) growth during the ossification process. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, p. e251970. <https://doi:10.1590/1519-6984.251970>.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução CONAMA n° 03, de 22 de agosto de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR 1990. Acesso em: 24 maio 2024.

Cui, W.T.; Cao, L.; Liu, J.H.; Ren, Z.H.; Zhao, B.; Dou, S.Z.; 2020. Effects of seawater acidification and cadmium on the antioxidant defense of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Science of the Total Environment*, v. 718, p. 137234. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137234>.

- da Costa, R.L.; Souza, I.C.; Morozesk, M.; de Carvalho, L.B.; Carvalho, C.D.S.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N.; Monteiro, D.A. 2024. Toxic, genotoxic, mutagenic, and bioaccumulative effects of metal mixture from settleable particulate matter on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Environmental Pollution*, v. 340 (1), p. 122846. <https://doi:10.1016/j.envpol.2023.122846>.
- Daher, N.; Saliba, N. A.; Sshihadeh, A. L.; Jaafar, M.; Baalbaki, R.; Sioutas, C. 2013. Chemical composition of size-resolved particulate matter at nearfreeway and urban background sites in the greater Beirut area. *Atmospheric Environment*, v. 80, p. 96-106.
- De Angelis, C. F.; Soares, M. P.; Cardoso, I. L.; Filogonio, R.; Taylor, E.W.; McKenzie, D. J.; Souza, I. C.; Wunderlin, D. A.; Monferrán, M. V.; Fernandes, M. N.; Leite, C. A. C. 2022. Settleable atmospheric particulate matter affects cardiorespiratory responses to hypoxia in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 257, p. 109353. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109353>
- Degarady, C. J.; Holbrook, R. S. 2006. Using Anurans as Bioindicators of PCB Contaminated Streams. *Journal of Herpetology*, v. 40, p. 127-130.
- Duellman, W. E.; Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibian*. Mc Graw-Hill, New York, 670
- Deponte, M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, Issue 5, p. 3217-3266, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
- Desmukh, D. K.; Deb, M. K.; Suzuki, Y.; Kouvarakis, G.N. 2013. Water-soluble ionic composition of PM_{2.5-10} and PM_{2.5} aerosols in the lower troposphere of an industrial city Raipur, the eastern central India. *Air Quality, Atmosphere and Health*, v. 6, p. 95-110.
- Dimmeler, S.; Zeiher, A. M. 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*, v 1, n 4.

- Duarte, L.F.A.; Ortega, A.S.B.; Paço, M.S.; Sadauskas-Henrique, H.; Cesar-Ribeiro, C.; Souza, I.C.; Monteiro, R.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N.; Pereira, C.D.S. 2023. Settleable atmospheric particulate matter harms a marine invertebrate: Integrating chemical and biological damage in a bivalve model. *Science of the Total Environment*, v. 881, p. 163380.
- Duellman, W. E.; Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. Baltimore e London. The John Hopkins University Press. Ed. 2, 670p.1994
- Duellman, W. E. 1999. *Patterns of Distribution of Amphibians –A Global Perpespective*. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press.
- ECOSOFT. 2019. *Inventário de Emissões Atmosféricas: Região da Grande Vitória. Ano base - 2015*. Vitória: [s.n.].
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr., V.; Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* v. 7, p. 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- EPA (USA Environmental Protection Agency), Creed, J.T., Brockhoff, C.A., Martin, T.D., 1994. Method 200.8, revision 5.4. determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma – mass spectrometry.
- ESPÍRITO SANTO. Governo do Estado do Espírito Santo. 2013. Decreto nº 3463-R, de 16 de dezembro de 2013. Estabelece novos padrões de qualidade do ar e dá providências correlatas. Espírito Santo.
- ESPÍRITO SANTO. 2011. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos – IEMA. *Caracterização e Quantificação de Partículas Sedimentadas na Região da Grande Vitória. Relatório Técnico*. Cariacica-ES.
- Falfushynska, H.; Gnatyshyna, L.; Fedoruk, O.; Mitina, N.; Zaichenko, A.; Stoliar, O.; Stoika, R. 2015. Hepatic metallothioneins in molecular responses to cobalt, zinc, and their nanoscale polymeric composites in frog *Rana ridibunda*. *Comparative*

Biochemistry and Physiology part C Toxicology & Pharmacology, v. 172-173, p. 45-56. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.04.006.

Fan, J.; Yang, J.; Cheng, F.; Zhang, S. 2023. The source, distribution, and environmental effects of suspended particulate matter in the Yangtze River System. *Water*, v. 15 (19), p. 3429. <https://doi.org/10.3390/w15193429>

Federici, G.; Shaw, B.; Handy, R. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, v. 84 (4), p. 415-430. <https://doi:10.1016/j.aquat ox.2007.07.009>.

Feihl, F.; Waeber, B.; Liaudet, L. 2001. Is nitric oxide overproduction the target of choices for the management of septic shock? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 91, n 3.

Fernandes, I.F., Utsunomiya, H.S.M., Valverde, B.S.L., Cassiel Ferraz, J.V., Fujiwara, G.H., Gutierrez, D.M., de Oliveira, C., Belussi, L.F., Fernandes, M.N., Carvalho, C.S. 2021. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Chemosphere*, v 275, 130000. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130000>.

Fernandes, I.F.; Fujiwara, G.H.; Utsunomiya, H.S.M.; Souza, I.C.; Monteiro, D.A.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N.; Carvalho, C.S. 2024. Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, (Shaw, 1802). *Chemosphere*, v 353, 141576. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141576>

Ferreira, D.; Motta, A.C.; Kreutz, L.C.; Toni, C.; Loro, V.L.; Barcellos, L.J.G. 2010; Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, v. 79, p. 914-921.

Flohé, L. & Günzler, W. A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 105, 114-121.

- Fortes, M.P.A.; Souza, I.C.; Azevedo, V.C.; Griboff, J.; Monferrán, M.V.; Wuderlin, D.A.; Matsumoto, S.T., Fernandes, M.N. 2023. Metal/metalloid bioconcentration dynamics in fish and the risk to human health due to water contamination with atmospheric matter from a metallurgical industrial area. *Science of the Total Environment*, v 902, 166119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166119>.
- França-Salgueiro, F.M. 2013. Avaliação da Toxicidade de Agrotóxicos Utilizados na cultura de Arroz Irrigados para Girinos de *Lithobates catesbeianus*. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.
- Franco-Belussi, L.; Fanali, L. Z.; De Oliveira, C. 2018. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022>
- Frost, Darrel R. 2024. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>
- Galvão, E.S.; Santos, J.M.; Reis Junior, N.C.; Feroni, R.S.; Orlando, M.T.D., 2022. The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and sources in an industrialized region of southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 194, p. 88. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09710-x>.
- Galvão, E. S.; Santos, J. M.; Goulart, E. V.; Reis Jr, N. C. 2023. Health risk assessment of inorganic and organic constituents of the coarse and fine PM in an industrialized region of Brazil. *Science of the Total Environment*. v. 865, p. 161042. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161042>
- Gashkina NA. 2024. Metal Toxicity: Effects on Energy Metabolism in Fish. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25(9), p. 5015. <https://doi.org/10.3390/ijms25095015>.
- Georgescu, S.R.; Mitran, C.I.; Mitran, M.I.; Caruntu, C.; Sarbu, M.I.; Matei, C.; Nicolae, I.; Tocut, S.M.; Popa, M.I.; Tampa, M. 2018. New insights in the pathogenesis of

HPV infection and the associated carcinogenic processes: the role of chronic inflammation and oxidative stress. *Journal of immunol resear*, v. 2018.

Gidney, J.T.; Twigg, M.V.; Kittelson, D.B. 2010. Effect of organometallic fuel additives on nanoparticle emissions from a gasoline passenger car. *Environmental Science & Technology*, v. 44, p. 2562-2569.

Gnach A.; Lipinski T.; Bednarkiewicz A.; Rybka J.; Capobianco J. A. 2015. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, v. 44, p. 1561-1584. <https://doi:10.1039/c4cs00177j>

Gokul, T.; Kumar, K.R.; Prema, P.; Arun, A.; Balaji, P.; Faggio, C. 2023. Particulate pollution and its toxicity to fish: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology part C Toxicology & Pharmacology*. <https://doi:10.1016/j.cbpc.2023.109646>.

González-Alvarez R, Ortega-Cuellar D, Hernández-Mendoza A, Moreno-Arriola E, Villaseñor- -Mendoza K, Gálvez-Mariscal A, Pérez-Cruz ME, Morales-Salas I, Velázquez-Arellano A. 2009. The hexokinase gene family in the Zebrafish: structure, expression, functional and phylogenetic analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology part B Biochemical and Molecular Biology*, v. 152, pp.189-195. <https://doi:10.1016/j.cbpb.2008.11.004>.

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

Gottlieb, M.G.V.; Morassutti, A.L.; Cruz, I.B.M. 2011. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. *Scientia Medica*. Porto Alegre, v. 21, p. 69- 80.

Gosset A, Ferro Y, Durrieu C. 2015. Methods for evaluating the pollution impact of urban wet weather discharges on biocenosis: A review. *Water Research*, v. 1;89, p. 330-54. <https://doi:10.1016/j.watres.2015.11.020>. PMID: 26720196.

Geurden, I. 2007. Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in

juveniles. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, n. 6, p. 2275- 2283.

Halliwell, B.; J.M.C. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.

Halliwell, B.; Clement, M. V.; Long, L. H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *Febs Letters*, v. 486, n. 1, p. 10-13.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Rad. Biol. Med.*, 3. ed. UK: Oxford University Press, 2000, p. 936.

Han, X.; Hao, X.; Wang, Y.; Wang, X.; Teng, L.; Liu, Z.; Zhang, F.; Zhang, Q. 2020. Experimental warming induces oxidative stress and immunosuppression in a viviparous lizard, *Eremias multiocellata*. *Journal of Thermal Biology*, 90, 102595.

Harun, A.; Jinan F, S.; Setiawan, B.; Komari, N. 2022. Interactions of heavy metals on enzymes in carbohydrate metabolism: In silico study on glucokinase and pyruvate kinase. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, v. 22 (2), p. 124-128. <http://journal.umy.ac.id/index.php/mm>

Hayes, T.B.; Falso, P.; Gallipeau, S.; Stice, M. 2010. The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, v. 213 (6), p. 921-933. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>

Hermann-Kleiter, N. 2008. The Nuclear Orphan Receptor NR2F6 Suppresses Lymphocyte Activation and T Helper 17-Dependent Autoimmunity. *Immunity* <https://doi:10.1016/j.immuni.2008.06.008>.

Hylland, K.; Haux, C.; Hogstrand, C. 1992. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Marine Ecology Programme.*, p. 89-96. Access in <https://www.jstor.org/stable/24832645>

- Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. 2017. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine*, v. 54, p. 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Israr, M. 2011. Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *Journal of hazardous materials*, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 1520-1526.
- Jenkins, C.N.; Pimm, S.L.; Joppa, L.N. 2013. Global Patterns of Terrestrial Vertebrate Diversity and Conservation. *PNAS* 110 (28): E2602-E2610. <https://doi:10.1073/pnas.1302251110>
- Jiang, Z.; Hunt, J. V.; Wolff, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical biochemistry*, v. 202, n. 2, p. 384-389.
- Jiang, Z.; Woollard, A. CS; Wolff, S. P. 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26, n. 10, p. 853-856.
- Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 180, 2018: 109-117, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022>.
- Junior, A. M. 2013. Projeto de monitoramento da qualidade do ar em porto alegre, Porto Alegre: ISBN.
- Junqueira, L.C. Alkaline and acid phosphatase distribution in normal and regenerating tadpole tails. *Journal Anatomy*, v. 1950 84(4), p. 369-73.
- Kanwar, J. R.; Burrow, H.; Baratchi, S. 2009. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16.

- Keen, J. H.; Jakoby, W. H. 1976. Mechanism for several activities of glutathione S-transferases. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 251, p. 6183-6188.
- Keen, J. E. 1992. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force–frequency relationships in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus Pelamis*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 70, n. 6, p. 1211-1217.
- Kloas, W.; Lutz, I. 2006. Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of Chromatography A*, v. 1130(1), p.16-27.
- Knowles, R. G.; Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, v 298.
- Kowalski, N.; Reichardt, A. M.; Waniek, J. J. 2016. Sinking rates of microplastics and potential implications of their alteration by physical, biological, and chemical factors. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 109, Issue 1, Pages 310-319, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.064>.
- Kumar, N.; Krishnani, K.K.; Singh, N.P. 2018. Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 25(9), p. 8914-8927. doi: 10.1007/s11356-017-1165-x.
- Layzer, R.B.; Rowland, L.P.; Bank, W.J. 1969. Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, p.3823–3831.
- Levesque, H.M.; Moon, T.W.; Campbell, P.G.; Hontela, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, v. 60 (3-4):257-67. [https://doi.10.1016/s0166-445x\(02\)00012-7](https://doi.10.1016/s0166-445x(02)00012-7).
- Levine, R.L. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, n. 1983, p. 464-478.

- Levine, R.L. 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 258(19), 11823-11827.
- Li, Z.; Yang, P.; Li, Z. 2014. The multifaceted regulation and functions of PKM2 in tumor progression. *Biochimica et Biophysica. Acta - Reviews on Cancer*, v. 1846, p. 285-296.
- Lima, F. S. 2021. Caracterização físico-química e avaliação da atividade antioxidante de extratos hidrossolúveis do perídio maduro do cogumelo *Calvatia bicolor*. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- Lima, L.L.C.; Oliveira, J.P.S.; Silva, L.E.B.; Santos, C.B. 2019. Características gerais dos anfíbios anuros e sua biodiversidade. *Diversitas Journal.*, v 4, n 3, p 774-789. <https://doi.10.17648/diversitas-journal-v4i3.844>.
- Longhini, L.S.; Zena, L.A.; Da Silva, G.S.F.; Bicego, K.C.; Gargaglioni, L.H. 2017. Temperature effects on the cardiorespiratory control of bullfrog tadpoles based on a non-invasive methodology. *Journal of Experimental Biology.*, v.1, p. 3763-3770.
- Loteste, A.; Scagnetti, J.; Simoniello, M.F.; Campana, M.; Parma, M.J. 2013. Hepatic enzymes activity in the fish *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) after sublethal cypermethrin exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 90 (5), p. 601-604. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-0961-3>
- Loumbourdis, N.S.; Kostaropoulos, I.; Theodoropoulou, B.; Kalmanti, D. 2007. Heavy metal accumulation and metallothionein concentration in the frog *Rana ridibunda* after exposure to chromium or a mixture of chromium and cadmium. *Environmental Pollution*, v. 145, p. 787-792.
- Lundsgaard, N.U.; Cramp, R.L.; Franklin, C.E.; Martin, L. 2020. Effects of ultraviolet-B radiation on physiology, immune function and survival is dependent on temperature: implications for amphibian declines. *Conservation Physiology*, v. 8 (1), coaa002. <https://doi:10.1093/conphys/coaa002>

- Lushchak, V.I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, v. 224:164-75. <https://doi.10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- Ma, Y. 2018. Effect of ambient air pollution on emergency room admissions for respiratory diseases in Beijing, China. *Atmospheric Environment*, v. 191, p. 320-327.
- Machado, L.P.; Kohayagawa, A.; Saito, M.E.; Silveira, V.F. da; Yonezawa, L.A. 2009. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 8, n. 1, p. 84-94.
- Magnani, N.D., Marchini, T., Garcés, M., Mebert, A., Cáceres, L., Diaz, L., Desimone, M., Evelson, P. 2016. Role of transition metals present in air particulate matter on lung oxygen metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 81, p. 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.10.009>
- Mary, S.C.H. 2014. Toxicology study on lead nitrate induced fresh water fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *European Journal of Academic Essays*, v. 1. n. 7. p. 5-8.
- McCord, J. M.; Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244 (22), p. 6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Mendonça, R.B.S. 2013. Estudos de espécies metálicas associadas ao MP10 e MP2,5 oriundos de emissões veiculares. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013
- Medina, M.F.; González, M.E.; Klyver, S.M.R.; Odstreil, I.M.A. 2016. Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cádmium. Institute of Biology, Faculty of Biochemistry, Chemistry, and Pharmacy, National University of Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina

- Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Wink, D.A. 2000. A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79, 237-240.
- Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 78, n. 3, p. 294-299.
- Moniruzzaman, M.; Kumar, S.; Das D.; Sarbajna, A.; Chakraborty, S.B. 2020. Enzymatic, non enzymatic antioxidants and glucose metabolism enzymes response differently against metal stress in muscles of three fish species depending on different feeding niche. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 202, p. 110954. <https://doi.10.1016/j.ecoenv.2020.110954>.
- Monteiro, R.; Souza, I.C.; Morozesk, M.; Soares, M.P.; De Angelis, C.F.; Vieira, N.S.; Bendhack, F.; Monferran, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N. 2023. 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* 330, 138715. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138715>
- Moretti, S.; Smets, W.; Hofman, J.; Mubiana, K.V.; Oerlemans, E.; Vandenneuvel, D.; Samson, R.; Blust, R.; Lebeer, S. (2019). Human inflammatory response of endotoxin affected by particulate matter-bound transition metals. *Environmental Pollution*, v. 244, p. 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.148>
- Morozesk, M.; Souza, I.C.; Fernandes, M.N.; Soares, D.C.F., 2021. Airborne particulate matter in an iron mining city: Characterization, cell uptake and cytotoxicity effects of nanoparticles from PM2.5, PM10 and PM20 on human lung cells. *Environmental Advances*, v. 6, p. 100125. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100125>
- Motta, V.T. Aminotransferases. *Bioquímica clínica para o laboratório*. 4. ed. Caxias do Sul: Editora Médica Missau, p. 117-118. 2003.
- Murillo, J.H.; Roman, S.R.; Marin, J.F.R.; Ramos, A.C.; Jimenez, S.B.; Gonzalez, B.C.; Baumgardner, D.G. 2013. Chemical characterization and source apportionment of

PM10 and PM2,5 in the metropolitan area of Costa Rica, Central America. *Atmospheric Pollution Research*, v. 4, p. 181-190.

Nääv, Å.; Erlandsson, L.; Isaxon, C.; Åsander Frostner, E.; Ehinger, J.; Sporre, M.K.; Kraus, A.M.; Strandberg, B.; Lundh, T.; Elmér, E.; Malmqvist, E.; Hansson, S.R. 2020. Urban PM2.5 Induces Cellular Toxicity, Hormone Dysregulation, Oxidative Damage, Inflammation, and Mitochondrial Interference in the HRT8 Trophoblast Cell Line. *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne). <https://doi:10.3389/fendo.2020.00075>.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2011. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5th Edition. Artmed, Porto Alegre, 1273.

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

Oliveira, C.R. 2016. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, p. 149.

Olson, W. J. 2019. Orphan Nuclear Receptor NR2F6 Suppresses T Follicular Helper Cell Accumulation through Regulation of IL-21. *Cell Reports*. <https://doi.10.1016/j.celrep.2019.08.024>

OMS. WHO 2021. Global air quality guidelines. Organização Mundial da Saúde. [S.l: s.n.].

O'Neill, L.A.J.; Kishton, R.J.; Rathmell, J. 2016; A guide to immunometabolism for immunologist. *Nature Reviews Immunology*.

Panetto, O.S.; Gomes, H.F.; Gomes, D.S.F.; Campos, E.; Romeiro, N.C.; Costa, E.P.; Carmo, P.R.L.; Feitosa; N.M.; Moraes, J. 2019. Os efeitos do Roundup (Glifosato [N-(Fosfano-metil) Glicina]) no desenvolvimento embrionário e metabolismo energético do peixe zebra (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*

part C: Toxicology & Pharmacology, v 222. p 74-81
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.007>.

Peltzer, M.P.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Cabagna-Zenklusen, M.C.; Repetti, M.R.; Sigrist, M.E. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, p. 142-151.

Peltzer, P.M.; Cuzziol Boccioni, A.P.; Attademo, A.M.; Simoniello, M.F.; Lener, G.; Lajmanovich, R.C. 2024. Ecotoxicological characterization of lithium as a “Timebomb” in aquatic systems: Tadpoles of the South American Toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) as model organisms. *Toxics*, v. 12, p. 176.
<https://doi.org/10.3390/toxics12030176>

Peluso, J.; Aronzon, C.M.; Rios de Molina, M.D.C.; Rojas, D.E.; Cristos, D.; Pérez Coll, C.S. 2020. Integrated analysis of the quality of water bodies from the lower Parana River basin with different productive uses by physicochemical and biological indicators. *Environmental Pollution*, v. 263, p. 114434.
<https://doi:10.1016/j.envpol.2020.114434>.

Pisoschi, A. M.; Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55-74.

Prashanth, M.S.; Neelagund, S.E. (2008) Impact of Cypermethrin on enzyme activities in the freshwater fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, v. 6(2), p. 91-95

Rainio, M. J.; Kanerva, M.; Salminen, J.P.; Nikinmaa, M.; Eeva, T.; Rogers, N.J.; Urbina, M.A.; Reardon, E.E; Mckenzie, D.J; Wilson, R.W. 2016. A new analysis of hypoxia tolerance in fishes using a database of critical oxygen level (*P crit*). *Conservation Physiology*. v 4.

Rio de Janeiro. Decreto nº 48.668, de 01 de setembro de 2023. Regulamenta os padrões de qualidade do ar no estado do Rio de Janeiro, tendo por base padrões nacionais e

as diretrizes e recomendações da organização mundial da saúde, e dá outras providências.

Rodrigues, R.A.R. 2006. Deposição atmosférica na bacia do alto curso do rio paquequer - Parque Nacional da Serra dos órgãos, Teresópolis, RJ. Dissertação de Mestrado - Niterói: Universidade Federal Fluminense.

Santos, J.M.; Reis Jr, N.C. 2011. Caracterização e quantificação de partículas sedimentadas na região da Grande Vitória. Relatório Técnico Instituto Estadual do Meio Ambiente.

Santos, J.M.; Reis, N.C.; Galvão, E.S.; Silveira, A.; Goulart, E.V.; Lima, A.T., 2017. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24 (27), p. 22026-22039. <https://doi.org/10.1029/2010RG000328>

Santos, N. 2018. Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 164, p. 297-304.

Schneider, J.; Hock, N.; Weimer, S.; Borrmann, S.; Kirchner, U.; Vogt, R.; Scheer, V. 2005. Nucleation particles in diesel exhaust: composition inferred from in situ mass spectrometric analysis. *Environmental Science & Technology*, v. 39 (16), p. 6153-6161. <https://doi.10.1021/es049427m>.

Segalla, M; Berneck, B.; Canedo, C.; Caramaschi, U.; Cruz, C.A.G.; Garcia, P. C. A.; Grant, T.; Haddad, C. F. B.; Lourenço, A. C.; Mangia, S.; Mott, T.; Nascimento, L. Toledo, L. F.; Werneck, F.; Langone, J. A. (2021). List of Brazilian Amphibians. *Herpetologia Brasileira*, v. 10(1), p. 121-216. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4716176>

Shaw G (1802) *General zoology or systematic natural history*. Volume III, Part 1. Amphibia. Thomas Davison, London.

Shuster-Meiseles T., Shafer, M.M., Heo, J., Pardo, M., Antkiewicz, D.S., Schauer, J.J., Rudich, A., Rudich, Y. 2016. ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in

roadway particulate matter deposited in urban environment. *Environmental Research*. v. 146, p. 252-262. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.009>

Silverthorn, D.U. 2003a. Metabolismo celular. In: *Fisiologia humana – uma abordagem integrada*. Barueri: Manole; p. 73-108.

Simões, R.S. 2014. *Etimologia de termos morfológicos*. São Paulo; 2014. p. 58.

Soares, M.P.; De Angelis, C.F.; Cardoso, I.L.; McKenzie, D.J.; Da Costa Souza, I.; Wunderlin, D.A.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M.N.; Leite, C.A.C. 2022. 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*, v. 257, p. 109330.

Soares, M.P.; Silva, L.M.; De Angelis, C.F.; Cardoso, I.L.; Taylor, E.W.; Souza, I.C.; Bendhack, F.; Vieira, N.S.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N.; Leite, C.A.C. 2024. Effect of acute exposure to settleable atmospheric particulate matter emitted by the steel industry on hematology and innate immunity of fat snook (*Centropomus parallelus*). *Marine Pollution Bulletin*, v 203, 116428. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116428>

Sotomayor, V.; Chiriotto, T.S.; Pechen, A.M.; Venturino, A. 2015. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, v. 119, p.48-53.

Sousa, D.O.T.; Sadauskas-Henrique, H. 2022. Uma revisão sobre os efeitos do material particulado atmosférico (MPA) aos organismos aquáticos. *UNISANTA Bioscience*, v. 11, p. 124.

Souza, P.A.de.; Mello, W.Z.; Mariani, R.L.; Sella, S.M. 2010. Caracterização do material particulado fino e grosso e composição da fração inorgânica solúvel em água em São José dos Campos (SP). *Química Nova*, v. 33, n. 6, p.1247-1253.

- Souza, D.Z., Vasconcellos, P.C., Lee, H., Aurela, M., Saarnio, K., Teinilä, K., Hillamo, R., 2014. Composition of PM_{2.5} and PM₁₀ collected at Urban Sites in Brazil. *Aerosol Air Quality Research*, v. 14, p. 168-176.
- Souza, I.C.; Morozesk, M.; Bonomo, M.M.; Azevedo, V.C.; Sakuragui, M.M.; Elliott, M.; Matsumoto, S.T.; Wunderlin, D.A.; Baroni, M.V.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M. N. 2018 a. Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 161, p. 260-269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.068>
- Souza, I.C.; Arrivabene, H.P.; Craig, C.A.; Midwood, A.J.; Thornton, B.; Matsumoto, S.T.; Elliott, M.; Wunderlin, D.A.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M.N. 2018b. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. *Science of the Total Environmental*, v. 640, p. 501-511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.302>.
- Souza, I.C.; Mendes, V.A.S.; Duarte, I.D.; Rocha, L.D.; Azevedo, V.C.; Matsumoto, S.T.; Elliott, M.; Wunderlin, D.A.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M.N. 2019. Nanoparticle transport and sequestration: intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. *Science of the Total Environmental*, v. 658, p. 798-808. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.142>.
- Souza, I.C.; Morozeskm M.; Mansano, A.S.; Mendes, V.A.S.; Azevedo, V.C.; Matsumoto, S.T.; Elliott, M.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Fernandes, M.N. 2021a. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environmental*, v. 753, p. 141976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141976>
- Souza, I.D.C.; Arrivabene, H.P.; Azevedo, V.C.; Duarte, I.D.; Rocha, L.D.; Matsumoto, S.T.; Franco, A.; Elliott, M.; Wunderlin, D.A.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M.N. 2021b. Different trophodynamics between two proximate estuaries with differing degrees of pollution. *Science of the Total Environmental*, v. 770, p. 144651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144651>.

- Souza, I.C.; Arrivabene, H.P.; Azevedo, V.C.; Duarte, I.D.; Rocha, L.D.; Matsumoto, S.T.; Franco, A.; Elliott, M.; Wunderlin, D.A.; Monferrán, M.V.; Fernandes, M.N. 2021. Different trophodynamics between two proximate estuaries with differing degrees of pollution. *Science of the Total Environment*, v. 770, p. 144651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144651>
- Souza, I. C.; Morozesk, M.; Siqueira, P.; Zini, E.; Galter, I.N.; De Moraes, D.A.; Matsumoto, S.T.; Wunderlin, D.A.; Elliot, M.; Fernandes, M.N. 2022. 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*, v. 814, 152685. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152685>
- Sun, Z.; Shao, Y.; Yan, K.; Yao, T.; Liu, L.; Sun, F.; Wu, J.; Huang, Y. The Link between trace metal elements and glucose metabolism: Evidence from zinc, copper, iron, and manganese-mediated metabolic regulation. *Metabolites*, v. 13, p. 1048.
- Sung, C.-C.; Hsu, Y.-C.; Chen, C.-C.; Lin, Y.-F.; E Wu, C.-C. 2013. Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- US EPA. Timeline of Particulate Matter (PM) National Ambient Air Quality Standards (NAAQS). 2021, from Particulate Matter (PM) Pollution | US EPA 2021. <https://www.epa.gov/pm-pollution/timeline-particulate-matter-pm-national-ambient-air-quality-standards-naaqs>
- Utsunomiya, H.S.M.; Ferraz, J.V.C.; Fujiwara, G.H.; Gutierrez, D.M.; Fernandes, I.F.; de Lacerda Valverde, B.S.; de Oliveira, C.; Franco-Belussi, L.; Fernandes, M.N.; Dos Santos Carvalho, C. 2022. Changes in blood parameters and metabolism in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, (Shaw, 1802) after exposure to the Sorocaba River (São Paulo, Brazil) water. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 30 (12), p. 33419-33431. <https://doi:10.1007/s11356-022-24590-5>.
- Uyeda, K.; Racker, E. 1965. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism-VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 24, p. 4682-4688

- Valko, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1-40, 2006.
- Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13(2), p. 57-149.
- Vanos, J. K.; Hebborn, C.; Cakmak, S. 2014. Risk assessment for cardiovascular and respiratory mortality due to air pollution and synoptic meteorology in 10 Canadian cities. *Environmental Pollution*, v. 185, p. 322-332.
- Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30 (5), p. 1323-1338.
- Velloso, J.C.R.; Biavatti, M.; Françóia, P.C.O.; de Mello, B.J.; de Almeida, A.C.; Bueno, G.E. 2021. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte / Oxidative stress: an introduction to the state of art. *Brazilian Journal of Development*, v. 7(1), p. 10152-10168. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-688>
- Vences, M.; Köhler, J. 2008. Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 569-580.
- Veronez, A.C.S.; Salla, R.V.; Baroni, V.D.; Barcarolli, I.F.; Bianchini, A.; Martinez, C.B.R.; Chippari-Gomes A.R. 2016. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquatic Toxicology*, v. 174, p. 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.011>
- Viarengo, A.; Lowe, D.; Bolognesi, C.; Fabbri, E.; Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology part C - Toxicology & Pharmacology*, v. 146, p. 281-300.
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. 1997. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to

Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, v. 44, p. 69-84.

Viarengo, A.; Burlando, B.; Ceratto, N.; Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*, v. 46, n. 2, p. 407-417.

Wells, K.D. 2007. *The ecology and behavior of amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press, 1400p.

Widmaier, E.P.; Raff, H.; Strang, K.T. 2013a. *Estrutura Celular, Proteínas e Metabolismo*. In: *Vander Fisiologia Humana - Os mecanismos das funções corporais*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.45-97.

Wilson, W.E.; Suh, H.H. 1997. Fine and coarse particles: concentration relationships relevant to epidemiologic studies. *Journal of the Air & Waste Management Association*, v. 47, p. 1238-1249.

Wink, D.A.; Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Pluta, R.M.; Hewett, S.J.; Colton, C.; Vitek, M.; Feelisch, M.; Grisham, M.B. 2011. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 3(2), p. 203-213. <https://doi.org/10.3390/metabo13101048>

World Health Organization. *Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen Dioxide*, 2003. 98 p.

World-Health-Organization. WHO. *Air Quality Guidelines for particular matter, ozone, dioxide and sulfur dioxide*. Global update 2005. Sum

Yang, H.S.; Sim, H.J.; Cho, H. 2020. Alpha-tocopherol exerts protective function against the mucotoxicity of particulate matter in amphibian and human goblet cells. *Scientific Reports*, v. 10, p. 6224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63085-6>

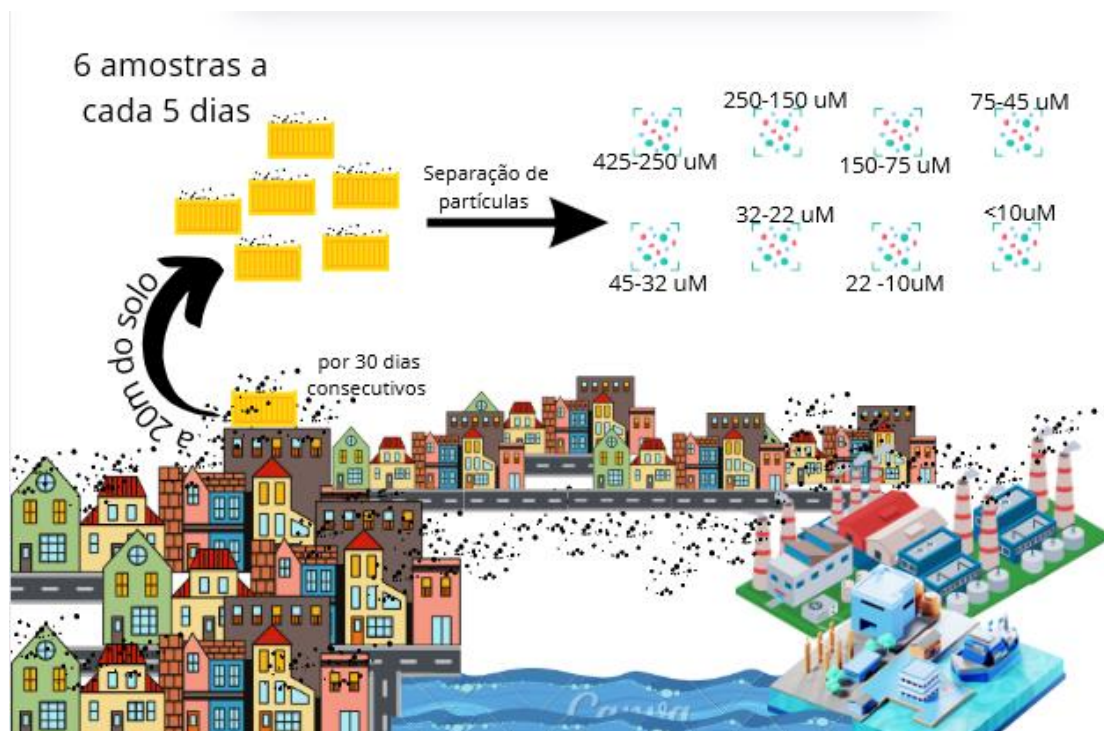
Yang, Y.; Yang, T.; Zhou, J.; Cao, Z.; Liao, Z.; Zhao, Y.; Su, X.; He, J.; Hua, J. 2022. Prenatal exposure to concentrated ambient PM_{2.5} results in spatial memory defects regulated by DNA methylation in male mice offspring. *Environmental Science and Pollution Research*.

- Zena, L.A.; da Silva, G.S.F.; Gargaglioni, L.H.; Bicego, K.C. 2016. Baroreflex regulation affects ventilation in cururu toad *Rhinella schneideri*. *Journal of Experimental Biology.*, v.219, p. 3605-3615.
- Zhang, X.; Zhang, W.; Zhao, L.; Zheng, L.; Wang, B.; Song, C.; Liu, S. 2024. Mechanisms of Gills Response to Cadmium Exposure in Greenfin Horse-Faced Filefish (*Thamnaconus septentrionalis*): Oxidative Stress, Immune Response, and Energy Metabolism. *Animals (Basel)*, v.14(4), p. 561. doi: 10.3390/ani14040561.
- Zhao, J.; Stenzel, M.H. 2018. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticles properties. *Polymer Chemistry*.
- Zhou, C.; Song, H.; Feng, J.; Hu, Z.; Yang, M.-J.; Shi, P.; Li, Y.-R.; Guo, Y.-J.; Li, H.-Z.; Zhang, T. 2022. Metabolomics and biochemical assays reveal the metabolic responses to hypo-salinity stress and osmoregulatory role of cAMP-PKA pathway in *Mercenaria mercenaria*. *Computacional and Structural Biotechnology Journal*. v. 20, p. 4110-4121. <https://doi.10.1016/j.csbj.2022.08.004>.

ANEXO 1

A coleta de MPA foi realizada pela ONG JUNTOS SOS Ambiental, com contêineres no telhado a cerca de 20 m do solo (Vitória, Brasil). As coletas foram realizadas em intervalos de 5 dias em um período total de 30 dias corridos (em uma área de 5000 m²) totalizando seis amostras. Depois da coleta foi realizada a separação dos tamanhos dessas partículas, os 6 primeiros tamanhos (425-250 µm, 250-150 µm, 150-75 µm, 75-45 µm, 45-32 µm e 32-22 µm) foram separados utilizando EML DIGITAL PLUS Test Siever Shaker (Haver & Boecker, Alemanha), enquanto os tamanhos 22-10 µm e ≤10 µm (PM10) foram separados por uma peneira de precisão Advanced Sonic Sifter (Advantech Manufacturing, EUA).

Figura 8 – Esquema da captação de material particulado atmosférico na região metropolitana da Grande Vitória – ES



ANEXO 2

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "IMPACTO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTÁVEL NA BIOTA AQUÁTICA: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS", protocolada sob o CEUA nº 4046210222 (0 001626), sob a responsabilidade de **Diana Amaral Monteiro** e equipe; **Cleoni dos Santos Carvalho**; **Regiane Luiza da Costa**; **Isabela Ferreira Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 07/03/2022.

We certify that the proposal "IMPACT OF SEDIMENTABLE ATMOSPHERIC PARTICULATE MATERIAL ON AQUATIC BIOTA: EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BIOMARKERS", utilizing 60 Amphibians (males and females), 60 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4046210222 (0 001626), under the responsibility of **Diana Amaral Monteiro** and team; **Cleoni dos Santos Carvalho**; **Regiane Luiza da Costa**; **Isabela Ferreira Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 03/07/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2022 a 03/2026 Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Anfíbios** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **10 a 16 dias** N: **60**
Linagem: **Lithobates catesbeianus** Peso: **2 a 6 g**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **3 a 6 meses** N: **60**
Linagem: **Astyanax sp** Peso: **15 a 30 g**

Local do experimento: 1) Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF)/ UFSCar, São Carlos Responsável: Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro 2) Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) Departamento de Biologia (DBio)/ UFSCar, Sorocaba Responsável: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

São Carlos, 11 de março de 2022

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos