

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS- CAMPUS SOROCABA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS

IRIS DE LIMA SOUZA

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES NO CÉREBRO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
Aquarana catesbeiana (Shaw, 1802) EXPOSTOS A MATERIAIS PARTICULADOS
ATMOSFÉRICOS**

SOROCABA

2025

IRIS DE LIMA SOUZA

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES NO CÉREBRO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
Aquarana catesbeiana (Shaw, 1802) EXPOSTOS A MATERIAIS PARTICULADOS
ATMOSFÉRICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba, para a obtenção do grau Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientação: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

SOROCABA-SP

2025

Souza, Iris de Lima

ANÁLISE DE BIOMARCADORES NO CÉREBRO DE
GIRINOS DE RÃ-TOURO Aquarana catesbeiana (Shaw,
1802) EXPOSTOS A MATERIAIS PARTICULADOS
ATMOSFÉRICOS / Iris de Lima Souza -- 2025.
30f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Cleoni dos Santos Carvalho

Banca Examinadora: Renata Fracácio Francisco, Bruno
Serra de Lacerda Valverde

Bibliografia

1. Metais. 2. Estresse oxidativo. 3. Anfíbios. I. Souza, Iris
de Lima. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

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

FOLHA DE APROVAÇÃO


IRIS DE LIMA SOUZA

ANÁLISE DE BIOMARCADORES NO CÉREBRO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
Aquarana catesbeiana (Shaw, 1802) EXPOSTOS A MATERIAIS PARTICULADOS
ATMOSFÉRICOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado como exigência para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos


Sorocaba, 07 de Julho de 2025

Assinaturas:

Documento assinado digitalmente
 **CLEONI DOS SANTOS CARVALHO**
Data: 07/07/2025 10:55:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Orientadora

Profª. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Documento assinado digitalmente
 **RENATA FRACACIO FRANCISCO**
Data: 07/07/2025 11:32:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 1

Dra. Renata Fracácio Francisco

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO SERRA DE LACERDA VALVERDE**
Data: 07/07/2025 12:27:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 2

Dr. Bruno Serra de Lacerda Valverde

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus guias espirituais, que com sabedoria, força, luz e proteção me sustentaram ao longo dessa caminhada. Agradeço à minha amiga Júlia Boletti, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e motivando todas as minhas escolhas. Ao meu irmão, biólogo e grande inspiração, que sempre me motivou a seguir em frente. Agradeço a professora Cleoni, minha orientadora, que esteve presente em cada etapa da iniciação científica e deste trabalho. Minha gratidão à Isabela Fernandes, que me acompanhou nas atividades de laboratório com paciência e cuidado. Ao grupo de amigas da biologia bacharel 2019, que compartilharam comigo cada desafio e aprendizado ao longo da graduação. Às moradoras da república Viracopos, minha primeira casa, que me acolheram com tanto carinho e me ajudaram a encontrar meu caminho no início da faculdade e também a moradia estudantil, pelo apoio financeiro, companheirismo e tantas horas divididas entre estudos, trabalhos e diversão.

Agradeço também à 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).

RESUMO

Os processos produtivos associados à expansão urbana e atividades agrícolas, vem apresentando grande impacto na disponibilidade de recursos limpos para a sobrevivência de diferentes espécies. O uso excessivo de compostos químicos, provindo de metais e metaloides utilizados nestes setores contribuem para a liberação de partículas contaminantes na atmosfera. Ao se depositarem em ambientes aquáticos, essas partículas atingem espécies presentes neste ecossistema, aumentando progressivamente a toxicidade ao longo da cadeia alimentar. Deste modo, este estudo buscou avaliar os efeitos da exposição ao material particulado atmosférico (MPA) no cérebro de girinos de *Aquarana catesbeiana* por meio de biomarcadores de exposição. Os resultados mostraram que juntamente com o aumento significativo das concentrações de metais na água de exposição, houve a bioacumulação desses metais no cérebro, ultrapassando a capacidade de desintoxicação do órgão e promovendo sua distribuição sistêmica. Entretanto, a presença dos metais não alterou os níveis da metalotioneína (MT) e da peroxidação lipídica (LPO), mas induziu à formação de malondialdeído (MDA). O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) demonstrou ser um biomarcador sensível para detecção precoce de estresse oxidativo, superando a resposta dos níveis de LPO e MTs. Deste modo, foi possível analisar que exposição ao MPA compromete a homeostase redox e representa um risco ecotoxicológico para girinos. Os achados sugerem que a poluição atmosférica representa uma ameaça potencial à fauna aquática e à saúde pública, com implicações na cadeia alimentar e no equilíbrio ecológico de ambientes aquáticos.

Palavras-chave: Metais; estresse oxidativo; contaminação; anfíbios.

ABSTRACT

The productive processes associated with urban expansion and agricultural activities have a high impact on the availability of clean resources for species survival. The excessive use of chemical compounds, derived from metals and metalloids used in these sectors, contributes to the release of particle contaminants into the atmosphere. When deposited in aquatic environments, these particles reach the species that occur in that ecosystem, progressively increasing the toxicity along the food chain. Thus, this study aimed to evaluate the effects of the exposition of brain tissues of tadpoles (*Aquarana catesbeiana*) to atmospheric particulate material (MPA) using biomarkers of exposure. The results showed that with the significant increase of metals in the water, there was a bioaccumulation of these metals on the brain, surpassing the organ detox capacity, and promoting their systemic distribution. However, the metal's presence did not change the levels of metallothionein (MT) and lipid peroxidation (LPO) but induced the malondialdehyde (MDA) formation. The test of TBARS demonstrated that it is a sensible biomarker for early detection of oxidative stress, overcoming the answer of LPO and MT levels. Thus, it was possible to analyze that tissue exposition to MPA compromises the redox homeostasis and represents an ecotoxicological risk to tadpoles. The findings suggest that atmospheric pollution represents a potential threat to aquatic fauna and to public health, with implications for the food chain and the ecological equilibrium of aquatic environments.

Keywords: Metals, oxidative stress, contamination, amphibians.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Níveis de metalotioneínas (MT, nmol SH/mg de proteína) no cérebro de *Aquarana catesbeiana*, comparando indivíduos do grupo controle (CTR) e os expostos ao material particulado atmosférico sedimentado (MPASe)..... 20
- Figura 2. Níveis de peroxidação lipídica (LPO, nmol/mg de proteína) no cérebro de *Aquarana catesbeiana* dos grupos controle (CTR) e exposto ao material particulado atmosférico sedimentado (MPASe)..... 21
- Figura 3. Concentração de malondialdeído (MDA, nmol/mg de proteína) no cérebro de *Aquarana catesbeiana* nos grupos controle (CTR) e exposto ao material particulado atmosférico (MPASe)..... 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração de metais presentes na água e no cérebro de girino de rã touro, nos grupos controle e expostos ao material particulado atmosférico sedimentado (MPASe).....	19
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AL- ALUMÍNIO

Ag- PRATA

As- ARSÊNIO

BSA- ALBUMINA DE SORO BOVINO

DNA- ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Ce- CÉRIO

Cd- CÁDMIO

Cr- CROMO

Cu- COBRE

EROS- ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

EO- ESTRESSE OXIDATIVO

Fe- FERRO

Hg- MERCÚRIO

La- LANTÂNIO

LPO- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

MDA- MALONDIALDEÍDO

Mn- MANGANÊS

MP- MATERIAIS PARTICULADOS

MPA- MATERIAIS PARTICULADOS ATMOSFÉRICOS

MPA_{Se}- MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO SEDIMENTADO

MT- METALOTIONEÍNA

Ni- NÍQUEL

Pb- CHUMBO

POA- PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTE

Se- SELÊNIO

SH- SULFIDRILAS

Sn- ESTANHO

Sr- ESTRÔNCIO

TBA- ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

TBARS- TESTE DE SUBSTÂNCIAS REAGENTES AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Ti- TÁLIO

V- VANÁDIO

Y- ÍTRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA A COLETA DOS MATERIAIS.....	14
3.1.1 Girinos de rã-touro.....	14
3.1.2 Coleta do MPA.....	14
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	15
3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	16
3.3.1 Concentração de proteínas pelo método Bradford.....	16
3.3.2 Conteúdo de metalotioneína.....	16
3.3.3 Peroxidação de Lipídeos.....	17
3.3.4 Malondialdeído.....	17
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

O sistema econômico tem exercido influência direta na qualidade ambiental atual. A pressão proveniente da indústria, expansão urbana e atividades agrícolas impacta diretamente a disponibilidade de recursos "limpos" para diversas espécies (PASCALICCHIO, 2002; FAN et al., 2023). Isso ocorre devido ao uso excessivo e indiscriminado de compostos químicos como medicamentos, defensivos agrícolas e metais, presentes em grande parte dos produtos e, sobretudo, no ambiente ocupacional, como garimpo e siderúrgicas, resultam na contaminação do solo, ar e da água (PASCALICCHIO, 2002; GOKUL et al., 2023).

Dentre os principais poluentes no ar atmosférico advindos das atividades antropogênicas estão os materiais particulados, um conjunto de partículas sólidas como poeira ou líquido em forma de gotículas suspensas na atmosfera, podendo conter substâncias altamente tóxicas para a saúde humana, dentre as quais podem se destacar os metais (ROSA et al., 2024).

Os metais se ligam a partículas orgânicas e devido a sua alta densidade se depositam e acumulam nos sedimentos de rios, lagos e oceanos, por processos físicos, químicos e biológicos caracterizando os materiais particulados atmosféricos sedimentados (MPASe), os quais apresentam risco ambiental significativo, pois uma vez absorvidos por organismos aquáticos afetam o funcionamento de toda a cadeia alimentar (CRUZ et al., 2009; SANTOS et al., 2017). Devido à sua natureza não biodegradável, esses materiais tendem a se acumular nos tecidos dos organismos, sobrecarregando o metabolismo e manifestando a sua toxicidade. Eles são então incorporados à cadeia alimentar e se acumulam em concentrações progressivas maiores a cada nível trófico, acarretando o aumento em quantidades significativas nos níveis mais altos, processo denominado de biomagnificação (ATLI, 2018).

Diversos estudos demonstram que os MPASe especialmente oriundo de áreas industriais como a siderurgia, pode representar um risco significativo aos organismos aquáticos (SOUZA et al., 2021; SOARES et al., 2022; ADORNO et al., 2023). Evidências indicam que peixes expostos a concentrações ecologicamente relevantes de MPASe, mesmo em curtos períodos, são capazes de acumular metais e nanopartículas metálicas em seus tecidos (SOUZA et al., 2021). Essa exposição resulta em estresse fisiológico, danos oxidativos e redução da capacidade de transporte de oxigênio, desencadeando respostas cardíacas compensatórias como hipertrofia, aumento da força contrátil, alterações no manuseio de cálcio intracelular e outros danos subletais (ADORNO et al., 2023).

Nesse contexto, a contaminação de ambientes aquáticos, por metais/metaloídeos, é um dos principais fatores investigados para explicar o aumento do declínio populacional de anfíbios nos últimos 25 anos (BEEBEE et al., 2005; VERONEZ et al., 2016; GIROTTO et al., 2020; FERNANDES et al., 2024). Isso se dá pois, devido a pele permeável a água, os anfíbios estão expostos aos contaminantes durante todo o seu ciclo de vida, desde os ovos, que não são protegidos por cascas, até a fase adulta, o que faz deles espécies extremamente sensíveis a esses contaminantes químicos (VERONEZ et al., 2016). Devido a essas características, os anfíbios são excelentes ferramentas de estudos toxicológicos, além de fonte valiosa para investigações, uma vez que possuem respostas fisiológicas e bioquímicas as quais amenizam as ações desses contaminantes (DOBROVOLJC et al., 2012; VERONEZ et al., 2016).

A exposição a compostos tóxicos, como os metais, pode ser avaliada por meio de biomarcadores, substâncias bioquímicas cuja presença, ausência ou alteração indicam a ação de um agente externo sobre o organismo (HOOK et al., 2014). Entre os tipos de biomarcadores, destacam-se os de exposição (ou de dose interna), que refletem respostas rápidas à presença de substâncias tóxicas, evidenciadas por modificações bioquímicas ou fisiológicas no organismo exposto (VAN DER OOST et al., 2003). Neste estudo, foram utilizados três biomarcadores relevantes: a metalotioneína (MT), a lipoperoxidação (LPO) e o malondialdeído (MDA), indicadores de estresse oxidativo e resposta à exposição a metais.

As metalotioneínas são proteínas com elevado teor de cisteína, capazes de se ligar a íons de metais com alta afinidade (YANG, et al., 2024). Embora sua função primária ainda não esteja completamente definida, diversas evidências indicam que as MTs desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase do zinco, um oligoelemento essencial para funções neuronais. Essas proteínas atuam como uma reserva intracelular de zinco, disponibilizando-o para enzimas recém sintetizadas e contribuindo, assim, para a prevenção da neurotoxicidade (MARET et al., 1998; MOUNAJI et al., 2002). Além disso, diferentes estudos sobre doenças originadas por desregulação metálica indicam que as MTs atuam ativamente nos processos de desintoxicação de metais em diferentes tecidos (PALMITER, 1998; YANG, 2024). Como uma das principais fontes de tióis nas células, as MTs contêm resíduos de cisteína que não apenas previnem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas também auxiliam na sua eliminação por meio de mecanismos de quelação, reduzindo os danos oxidativos ao organismo (YANG, 2024).

Assim como ocorre com as proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, os lipídeos também são alvos das EROs. Quando os radicais livres atacam os lipídeos presentes nas membranas celulares, desencadeiam o processo de peroxidação lipídica, que resulta na

formação de múltiplas moléculas de degradação, as quais podem compor produtos tóxicos e altamente reativos como o malondialdeído (AYLA et al., 2014). Esses metabólitos podem comprometer a integridade das membranas, levando ao desenvolvimento de diversas alterações celulares associadas a doenças degenerativas, distúrbios neurológicos, mutações genéticas, carcinogênese e até mesmo ao envelhecimento precoce e são atualmente utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo. Além disso, metais tóxicos podem atuar como catalisadores nesse processo, contribuindo diretamente para a iniciação e propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (LEE, 2019).

Deste modo, a obtenção de dados relacionados às respostas bioquímicas à toxicidade de metais em tecidos de girinos, contribuem para determinar padrões de contaminação, auxiliar no controle do uso nas indústrias e contribuir na ecotoxicologia de girinos, uma vez que se trata da participação em um projeto inovador e com abordagens ainda então não analisadas. Assim, nossa hipótese é que os componentes do material particulado atmosférico (MPA) causam efeitos tóxicos significativos no cérebro de girinos de rãs-touro após 96h de exposição, representando risco potencial para organismos aquáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Verificar se a exposição ao material particulado atmosférico causa efeitos tóxicos significativos no cérebro de girinos de rã-touro após 96h de exposição.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o conteúdo de metalotioneína no cérebro
- Quantificar a peroxidação de lipídeos
- Quantificar o malondialdeído
- Relacionar estes biomarcadores com os metais detectados na água e no cérebro

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA A COLETA DOS MATERIAIS

3.1.1 Girinos de rã-touro

Os procedimentos empregados para a coleta dos materiais foram realizados por Fernandes et al. (2024). Os girinos de rã-touro *Aquarana catesbeiana* foram obtidos da fazenda RANAMAT, localizada em Matão, São Paulo (21°39'03.18"S, 48°23'12.61"W). Os animais foram embalados em sacos plásticos contendo água com capacidade para 80 litros e imediatamente transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparada (DCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os animais foram aclimatados por 10 dias em tanques de 500 litros contendo água da torneira descolorada com temperatura e alimentação controladas. A alimentação com ração comercial contendo 40% de proteína bruta (Alcon®) foi suspensa 48 horas antes do início da exposição aos metais.

3.1.2 Coleta do MPA

As amostras de MPA foram coletadas na estação Ilha do Boi e Enseada do Suá, próximos ao Complexo Tubarão, Espírito Santo, Brasil (20°17'03.8"S, 40°14'24.9"W), a coincidir com os períodos de inverno, primavera, verão e outono, que apresentam intensidade pluviométrica diferentes e, portanto, podem sofrer menor ou maior influência dos processos de remoção úmida. O Complexo Tubarão localizado na área costeira entre a cidade de Vitória e Serra, é um complexo minero-siderúrgico, com atividades que incluem a pelotização, estocagem e transporte de minério de ferro e produção de aço com diferentes ligas metálicas que emitem uma fumaça metálica no ambiente.

As coletas foram efetuadas com o equipamento HiVol (AirMetrics, Oregon, USA) cujos dispositivos de impactação selecionam as partículas sedimentáveis e em suspensão. Este material, no formato de pó, foi coletado pela ONG Juntos SOS Ambiental em parceria com o Núcleo de Estudos da Qualidade do Ar do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (ES), mantido em recipientes plásticos em temperatura ambiente e enviados à UFSCar.

As amostras de MPA foram caracterizadas após dissolução em água ultrapura, em meio aquoso ao qual foram expostos os girinos.

A exposição compreendeu um grupo controle, livre de MPASe, e um grupo exposto a 1 g L^{-1} de MPASe. Essa concentração é baseada nas taxas de deposição ($\sim 10\text{--}20 \text{ g m}^{-2}$ a cada 30 dias) de MPA na Região Metropolitana de Vitória durante a estação chuvosa (SANTOS et al., 2017), e representa uma taxa de deposição de aproximadamente 18 g m^{-2} a cada 30 dias.

Os experimentos foram conduzidos em aquários de 200 L contendo 20 animais por aquário, em sistema estático por 96 horas, realizados em triplicata. Os tanques foram mantidos em condições controladas sendo todos esses parâmetros monitorados diariamente, mantidos constantes e protegidos de distúrbios externos. Os parâmetros físicos e químicos da solução-teste, medidos no início e ao final das 96 h do ensaio, permaneceram semelhantes, sendo monitorados regularmente durante todo o período de exposição. Após a exposição, os girinos foram eutanasiados com benzocaína 0,01%, descerebrados e os tecidos coletados para as determinações bioquímicas (FERNANDES et al., 2024).

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.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram preparadas a partir de um “pool” com três cérebros de girinos, sendo um N amostral de oito para cada grupo, oito para o grupo controle e oito para o exposto ao MPASe. Os tecidos foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão fosfato salina (PBS), 0,1 M, pH 7,2, e, em seguida, centrifugados a 12.000 g durante 20 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As alíquotas foram separadas do sobrenadante e, em seguida, pipetadas em placas de $200 \text{ }\mu\text{L}$ e $100 \text{ }\mu\text{L}$, sendo armazenadas em biofreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para análises futuras.

As análises bioquímicas foram realizadas individualmente em amostras dos tecidos após cada experimento, sendo mantidas em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ após homogeneização e centrifugação, de acordo com a análise a ser realizada. As leituras foram conduzidas a partir do sobrenadante dos homogeneizados em leitora de microplaca (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek, EUA), e realizadas em triplicatas. Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores (LaBioM), do Departamento de Biologia (DBio) da UFSCar-Sorocaba.

3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Concentração de proteínas pelo método Bradford

A quantificação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (KRUGER, 1994). Esse método se baseia na interação entre o corante BG-250 e proteínas que contêm aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da ocorrência, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz no comprimento de onda de 595 nm.

Em seguida, foi adicionada albumina em diferentes concentrações para a construção da curva padrão [0,125; 0,250; 0,500 e 1,0 mg de albumina de soro bovino (BSA)/mL, preparada em PBS] e 200 μ L de reagente de Bradford. Após 5 minutos, a absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas.

As alíquotas, das amostras biológicas, separadas anteriormente, foram descongeladas e pipetadas (10 μ L por poço) em triplicatas na microplaca, sendo os últimos três poços utilizados como branco. O procedimento foi o mesmo feito para a curva padrão com adição de 10 μ L da amostra e 200 μ L de reagente de Bradford. A concentração de proteína das amostras foi obtida a partir da curva padrão de proteína para as análises seguintes.

3.3.2 Conteúdo de metalotioneína

A determinação da metalotioneína foi realizada a partir da concentração de grupos SH (sulfidrila), de acordo com o método de Viarengo et al. (1997), com modificações. Esse método consiste na avaliação do conteúdo de resíduos de SH utilizando o reagente de Ellman [5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) - DTNB] a 412 nm, uma vez que as metalotioneínas são classificadas por um alto teor de cisteínas (aproximadamente 20-30%) em comparação com outras proteínas presentes nos extratos etanólicos.

Para a obter uma fração de MT parcialmente purificada, 200 μ L do sobrenadante foram adicionados a uma solução etanol/clorofórmio com posterior centrifugação a 6.000 g por 10 minutos a 0-4 °C. Ao sobrenadante foi adicionada uma solução de NaCl 250 mM, HCl 1 M e etilenodiaminotetracético (EDTA) 4 mM.

A quantificação de MT foi realizada utilizando NaCl 2 M, DTNB 0,43 mM em fosfato fosfato 0,2 M, pH 8,0 (reagente de Ellman), com absorção medida por espectrofotometria a 412 nm.

3.3.3 Peroxidação de Lipídeos

A determinação do nível de peroxidação lipídica foi realizada pelo método FOX (Ferrous Oxidation/Xylenol Orange Method – oxidação ferrosa/ensaio de laranja de xilenol) (JIANG et al., 1991). Esse método baseia-se na rápida oxidação do Fe^{2+} mediada por peróxidos sob condições ácidas e na posterior formação do complexo Fe^{3+} -laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (BHT), que absorve luz a 570 nm.

A concentração de LPO foi determinada em 100 μ L de amostras previamente desproteinizadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% e 400 μ L de mistura de ocorrência contendo $FeSO_4$ 0,25 mM, H_2SO_4 25 mM, laranja de xilenol 0,1 mM e BHT 4 mM em 90% (v/v) de metanol. Os brancos continham todos os componentes sem sobrenadante, acrescidos de 100 μ L de PBS. As misturas foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente antes das leituras a 570 nm. O hidroperóxido de cumeno (CHP) foi usado como padrão.

3.3.4 Malondialdeído

A concentração de MDA foi realizada por meio do ensaio TBARS, determinada de acordo com o método descrito por Federici et al. (2007). O método consiste na reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo um aduto vermelho fluorescente cromógeno intensamente colorido o qual pode ser medido por equipamentos como espectrofotômetro.

As alíquotas de tecidos homogeneizados foram colocadas em microplacas contendo BHT 1 M e PBS 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, foram adicionados TCA 50% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3%. A microplaca foi incubada a 40 °C por 80 minutos, seguida de dois ciclos de baixa rotação por 5 minutos. Após resfriada em temperatura ambiente as absorbâncias foram medidas a 535 nm. Para o branco, foram acrescentados 30 μ L de água destilada no lugar da amostra.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os cálculos como médias das triplicatas, diferenças, equação da reta, desvio padrão e quantificação de concentração de sulfidrilas (MT), LPO e MDA foram realizados via planilhas no excel e em seguida analisadas estatisticamente por meio do software SigmaStat 3.5 (Copyright © 2006, Systat Software, Inc.), R e RStudio 4.5. As tabelas finais foram construídas com base nas correlações entre os biomarcadores e os metais presentes no cérebro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo os dados de Fernandes et al. (2024) a água de MPASe continha 18 dos 28 metais/metalóides identificados no MPA, com destaque para concentrações elevadas de ferro Fe, Al, Sr, Pb, Cu e manganês Mn (Tabela 1). Os níveis de Fe e Al foram 18 vezes maiores do que na água controle. Os metais Pb, Cu, Mn e Cr estavam de 10 a 20 vezes mais concentrados que no controle. Alguns elementos como Cd, Cu e Pb ultrapassaram os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. Outros metais detectados em menores concentrações (entre 2,15 e 0,06 µg/L) incluíram Ni, Sn, V, Ti, Ce, La e Y. Elementos como As, Se, Hg e Ag não foram detectados. Os dados indicam contaminação da água por metais, sugerindo potenciais riscos ecotoxicológicos.

O aumento nas concentrações dos metais como o Fe, Al, Sr, Pb, Cu e Mn na água do grupo MPASe em relação ao controle (Tabela 1) pode ser atribuído devido a interação dos metais com a água, que, dependendo da reatividade de cada elemento, pode resultar na liberação de íons metálicos na solução. Metais mais reativos, como o estrôncio (Sr), reagem diretamente com a água, formando hidróxidos metálicos na solução. Os metais como Fe, Al, Pb, Cu e Mn não apresentam relação direta com a água em temperatura ambiente, mas podem sofrer processos de oxidação na presença de oxigênio dissolvido e outras espécies presentes no meio. Esses processos promovem a liberação gradual de íons metálicos, como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Mn^{2+} , elevando a concentração iônica da solução ao longo do tempo (BROWN, et al., 2014).

Além da água, a concentração de metais no tecido cerebral dosadas por Fernandes et al. (2024) revelou alterações significativas entre os grupos controle e exposto ao MPASe (Tabela 1). Observou-se um aumento expressivo nos níveis de Fe^{56} , Sr, Cu, Mn e Cr no grupo exposto, sendo os aumentos mais notáveis para o estrôncio (↑ 12,86 vezes), também com o

maior fator de bioconcentração e Fe⁵⁶ (↑ 4,46 vezes). Por outro lado, o alumínio apresentou uma redução significativa na concentração (↓ 10,68 vezes) em comparação ao grupo controle. Esses dados sugerem que a exposição ao MPASe pode promover acúmulo seletivo de determinados metais no cérebro.

A identificação e determinação dos metais no cérebro (Tabela 1) indicam que houve uma sobrecarga de metais nos rins e no fígado, órgãos destacados em outros estudos pelo papel de armazenamento, desintoxicação e eliminação desses elementos nos anfíbios (LOUMBOURDIS, et al., 1998; BORKOVIĆ-MITIC et al., 2016; FERNANDES et al., 2024). Deste modo, a presença dos metais em outros órgãos ocorre quando os níveis do elemento no fígado e nos rins excedem a capacidade dos mecanismos de desintoxicação de removê-los, assim os metais podem chegar por meio da corrente sanguínea em diferentes tecidos inclusive no cérebro (CARVALHO et al., 2017).

Tabela 1- Concentração de material particulado atmosférico (MPA), metais presentes na água e no cérebro de girinos de rã-touro, nos grupos controle (CTR) e expostos ao material particulado atmosférico sedimentado (MPASe), expresso em ug/g. ↑↓ Indicam aumento ou redução em relação ao controle; números em negrito representam diferença significativa em relação ao controle. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (D.P.); N = 3 (número de indivíduos por grupo). Limite de detecção (LOD) Fe⁵⁶: 3,893; Cu: 0,45; Mn: 0,383; Cr: 0,08. Limite de Quantificação (LOQ) Cu: 1,092.

Metal	MPA	Água CTR	Água MPASe	Varição	Cérebro CTR	Cérebro MPASe	Varição
Fe⁵⁶	1257,4±40,87	LOD	1716,3 ± 296,13	↑	108,15 ± 3,68	482,42 ± 8,58	↑ 4,5x
Al	79,39 ± 3,25	17,91 ± 2,09	1120,62 ± 177,52	↑70x	60,24 ± 11,63	5,64 ± 1,33	↓ 10,6x
Sr	69,10 ± 0,901	14,42 ± 0,01	↑29,15 ± 4,56	↑ 2x	15,57 ± 2,83	200,3 ± 41,45	↑ 12,8x
Cu	LOD	LOQ	11,28 ± 3,40	↑	3,65 ± 0,03	9,9 ± 0,26	↑ 2,71x
Mn	12,69 ± 0,34	LOD	105,36 ± 25,19	↑	1,37 ± 0,44	2,88 ± 0,28	↑ 2,1x
Cr	LOD	0,18 ± 0,03	5,11 ± 0,76	↑ 28x	8,09 ± 0,26	10,78 ± 2,33	↑ 1,3x

Fonte: Fernandes et al. (2024).

Após 96h de exposição a 1g/L de MPA foi possível verificar alterações nos valores dos biomarcadores. As análises estatísticas para MTs e LPO no cérebro de *A. catesbeiana* não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (Figuras 1 e 2, respectivamente). Para o ensaio TBARs, os valores de MDA foram, $2,71 \pm 0,696$ nmol/ mg para o controle e $3,56 \pm 0,764$ nmol/ mg para o exposto, variando em 31,37%. As análises estatísticas apresentaram valores significativos com $p = 0,049$ (Figura 3).

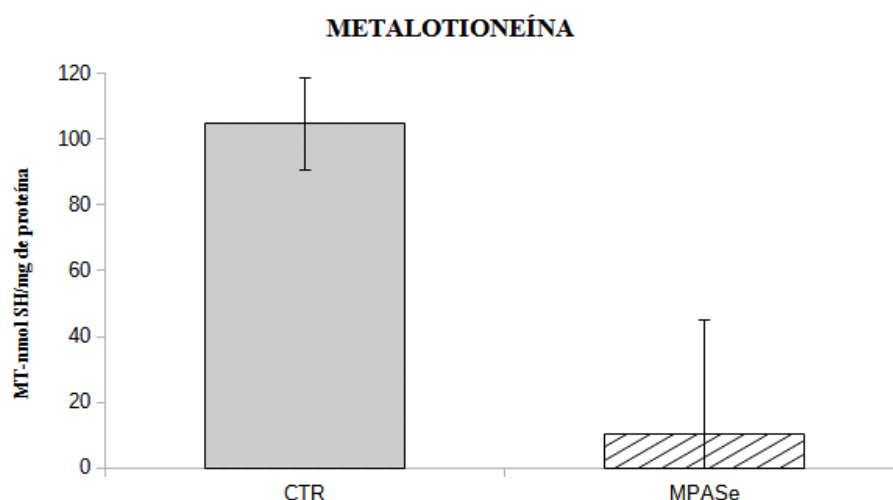


Figura 1 - Metalotioneínas (MT, nmol SH/mg de proteína) no cérebro de *A. catesbeiana*, provenientes do grupo controle (CTR) e expostos ao material particulado atmosférico sedimentado (MPASe). Os valores são expressos como média \pm D.P (N= 7-8), $p = 0,35$.

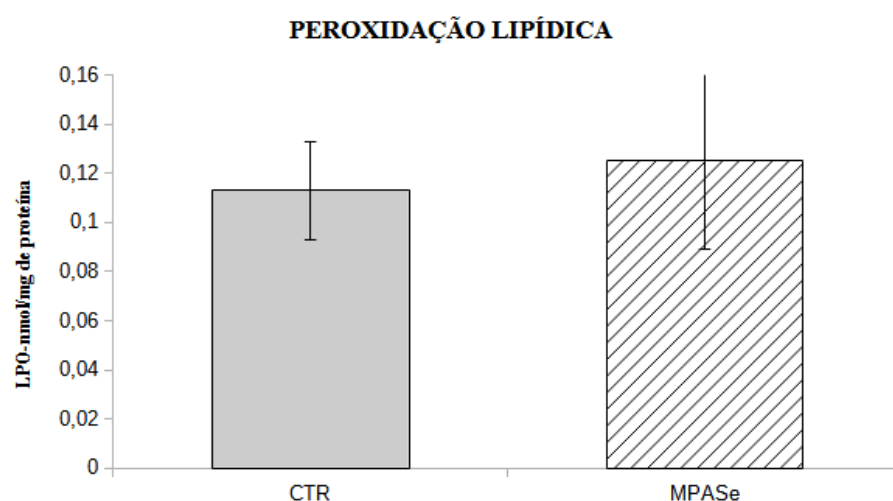


Figura 2- Peroxidação lipídica (LPO, nmol/mg de proteína) no cérebro de *A. catesbeiana*, provenientes do grupo controle (CTR) e expostos ao material particulado atmosférico sedimentado (MPASe). Os valores são expressos como média \pm D.P (n = 7-8), $p = 0,40$.

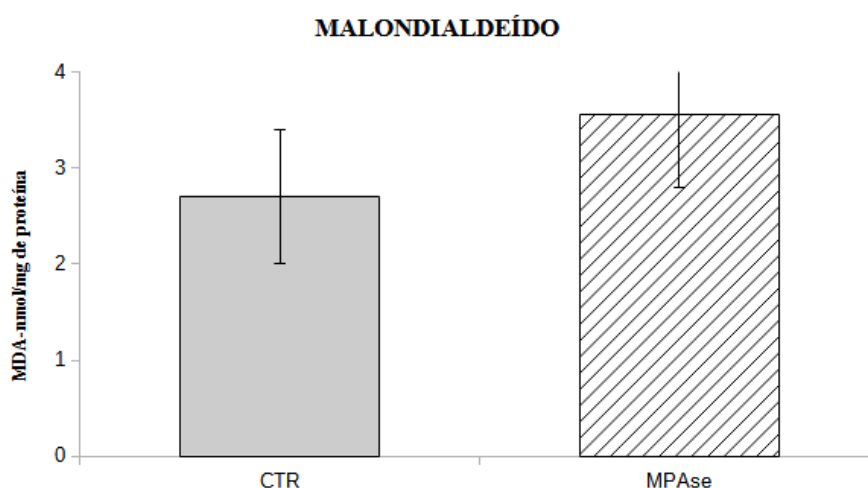


Figura 3- Malondialdeído (MDA, nmol/mg de proteína) no cérebro de *A. catesbeiana*, provenientes do grupo controle (CTR) e expostos ao material particulado atmosférico sedimentado (MPAse). Os valores são expressos como média \pm D.P (n = 7–8) p = 0,048.

O acúmulo de metais como o Fe, Cu e Cr (Tabela 1), induzem a produção de espécies altamente reativas levando a disfunção e ao desequilíbrio de radicais livres (VALKO et al., 2005; KRISHNAMURTHY et al., 2024). A formação desses radicais livres causa várias modificações nas bases do DNA, induz a LPO e alteração da homeostase (ETSUO, 2009). Os peróxidos lipídicos, formados pelo ataque desses radicais a resíduos de ácidos graxos poli-insaturados de fosfolípidios, podem reagir ainda mais com metais redox, produzindo finalmente malondialdeído (VALKO et al., 2005; ETSUO, 2009). As propriedades eletrofílicas dos aldeídos, como o MDA reagem facilmente com nucleobases, impedindo a estabilidade do genoma de diversas maneiras, incluindo a paralisação da forquilha de replicação, trocas de cromátides-irmãs, ligações cruzadas entre fitas e quebras de fitas simples e duplas de DNA, produzindo aductos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos (LOPACHIN et al., 2014; VIJAYRAGHAVAN et al., 2023).

Dentre diversos metabólitos que podem ser formados como produtos secundários da peroxidação lipídica, o MDA, é um dos marcadores mais populares e confiáveis para determinar o estresse oxidativo, extensivamente estudado e considerado o produto mais mutagênico do processo de LPO (ESTERBAUER, 1990; AYALA et al., 2014).

A elevação dos níveis de MDA observada nos girinos expostos aos materiais particulados indica um aumento nas reações de peroxidação lipídica, sugerindo um processo de estresse oxidativo no cérebro, uma vez que produtos de aldeídos são usados como

biomarcadores de estresse oxidativo *in vivo* e atuam como moléculas bioativas capazes de desencadear processos inflamatórios (LOPACHIN et al., 2014; LEE et al., 2019; VIJAYRAGHAVAN et al., 2023). Isso está em concordância com a literatura, que aponta que a maioria das doenças, inclusive distúrbios neurológicos e degenerativos, envolve, em algum momento, reações com radicais livres e lesão tecidual (HALLIWELL et al., 1992; SHOHAG et al., 2022). Dessa forma, o acúmulo de metais nos tecidos neurais dos girinos pode ter induzido o estresse oxidativo, levando a produção de EROS e manifestações fisiológicas maiores.

O aumento de MDA observado neste estudo corrobora os achados de Fernandes et al. (2024), que relataram um acréscimo significativo na concentração de carbonilas proteicas (PCO) no cérebro de girinos de *A. catesbeiana* (85%; $p = 0,002$) expostos ao MPASe. Esse aumento é indicativo de dano celular associado ao estresse oxidativo provocado pela exposição a metais. É amplamente reconhecido que as EROs podem converter grupos amino de proteínas em grupos carbonila ($=CO$), alterando sua estrutura e função de maneira irreversível. A oxidação induzida por metais pode intensificar esse processo, promovendo a formação de carbonilas e elevando ainda mais os níveis de EROs (FEDOROVA et al., 2014; KRISHNAMURTHY et al., 2024).

Embora os níveis de MT no cérebro dos girinos expostos ao MPASe não tenham sido significativos estudos indicam que a leve redução da MTs pode indicar uma inibição da síntese ou um consumo excessivo dessas proteínas frente ao estresse oxidativo (LU et al., 2018). Outros estudos apontam que a presença combinada de metais, como a natureza específica de MPA de misturas complexas de metais, hidrocarbonetos e outros poluentes pode interferir na expressão de MTs, especialmente quando há competição por grupos de sulfidrilas (VAN DEN HURK et al., 2000; LU et al., 2018). Além disso, a exposição prolongada ou em doses mais elevadas pode levar ao esgotamento das reservas de MTs, uma vez que essas proteínas não apenas se ligam a metais tóxicos para reduzir sua biodisponibilidade, mas também atuam como antioxidantes, neutralizando EROs. Assim, em condições de estresse intenso, a demanda por MTs pode superar a sua síntese, resultando em níveis reduzidos.

A pele dos anfíbios possui um sistema de defesa altamente especializado, que inclui a produção de peptídeos antimicrobianos com propriedades antioxidantes significativas, denominadas peptídeos antioxidantes (POAs), capazes de reduzir os níveis de EROs. Esses peptídeos atuam na eliminação de radicais livres, ativando sistemas antioxidantes enzimáticos

e inibindo danos celulares. Com isso, auxiliam na prevenção de processos patológicos relacionados ao estresse oxidativo (EO), como doenças neurodegenerativas e cânceres, que compartilham vias comuns como disfunção mitocondrial, inflamação e ativação de vias de morte celular (FENG et al., 2021; ORTÍZ et al., 2025).

A fisiologia do cérebro torna esse órgão especialmente vulnerável ao estresse oxidativo, devido à sua elevada demanda energética, alto consumo de oxigênio, presença abundante de ácidos graxos poli-insaturados, alta concentração de ferro e principalmente, porque esse órgão utiliza espécies reativas quimicamente para executar suas funções sinalizadoras, fatores que favorecem a formação de EROS e danos oxidativos subsequentes (COBLEY et al., 2018). Nesse contexto, a presença dos metais (tabela 1) observada no cérebro dos girinos expostos ao MPASe pode estar associada à vulnerabilidade do tecido cerebral a qual compromete a integridade funcional e estrutural desse sistema.

De modo geral, o teste de TBARS, dosado por quantificação de MDA, demonstrou ser um biomarcador sensível e eficaz para a detecção de estresse oxidativo em comparação com outros biomarcadores como LPO e MT. O MDA é um dos principais produtos finais da degradação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, sendo rapidamente formado em resposta à ação de radicais livres (AYLA et al., 2014). Além disso, por ser uma molécula relativamente estável e facilmente detectável por espectrofotometria, a sensibilidade do ensaio TBARS permite uma quantificação confiável do impacto do estresse oxidativo em tecidos. Assim, o aumento significativo dos níveis de MDA por TBARS em tecidos expostos a agentes tóxicos pode ser considerado um indicador precoce e robusto de disfunção oxidativa (ISLAYEM et al., 2022).

A exposição a contaminantes como o MPA pode comprometer o desenvolvimento, o comportamento e a sobrevivência dos girinos. Embora este estudo tenha sido conduzido com uma espécie exótica, os efeitos observados refletem potenciais riscos também para espécies nativas, especialmente em ambientes onde há acúmulo de poluentes atmosféricos nos corpos d'água. Ao longo do tempo, esse cenário pode contribuir para o declínio populacional de anfíbios nativos.

Considerando que girinos exercem um papel essencial como indicadores ecológicos e componentes fundamentais da cadeia trófica, sendo presas de peixes, aves e répteis a redução de suas populações pode desencadear desequilíbrios ecológicos significativos.

5 CONCLUSÃO

A exposição de girinos de rã-touro a 1 g/L de MPA por 96 horas resultou em efeitos tóxicos mensuráveis no tecido cerebral. Dentre os biomarcadores analisados, o aumento nos níveis de TBARS, indica maior sensibilidade desse método frente aos demais. Esses efeitos estão diretamente relacionados à presença de metais detectados na água de exposição, os quais têm potencial para induzir estresse oxidativo. Os níveis de LPO e de MT não foram significativos, entretanto, o cérebro apresentou altas concentrações de metais. Os resultados sugerem que TBARS se destaca como um biomarcador mais sensível e eficaz na detecção de danos oxidativos em comparação com LPO e MT. Este estudo reforça a relevância do monitoramento da contaminação por MPA em ambientes aquáticos, especialmente devido aos riscos potenciais ao desenvolvimento neural de anfíbios e às suas implicações ecológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADORNO, H. A., et al., 2023. A multi-biomarker approach to assess the sublethal effects of settleable atmospheric particulate matter from an industrial area on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Research*, v. 237, p. 117987. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>.
- 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. Annual Book of Standards, v. 11, p. 220-240.
- ATLI, G., 2018. The effect of waterborne mercury and nickel on the ATPases and AChE activities in the brain of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) depending on the Ca²⁺ concentrations. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 19, p. 363- 371. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_5_01.
- AYALA, A., et al. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. v. 2014 p. 31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- BEEBEE, T.J.C., et al., 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Conservation Biology*, v. 125, p. 271-285. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>.
- BRASIL. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. seção 1, n. 53, p. 58-63.
- BORKOVIĆ-MITIĆ et al., 2016. Biomarkers of oxidative stress and metal accumulation in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 9649–9659. doi: 10.1007/s11356-016-6167-1.
- BROWN, T. L., et al. 2014. Química: a ciência central. Pearson Prentice Hall, v. 12, cap. 19-20.
- CARVALHO, C. S., et al., 2017. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environmental pollution*. 221, 445–452. <https://doi:10.1016/j.envpol.2016.12.012>.
- COBLEY, J. N., et al., 2018. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, v. 15, p. 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>.
- CRUZ, M.B., et al., 2009. Absorção de metais pesados presentes em efluentes de mineração por *Pistia stratlotes*. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, Embrapa, p. 1-3.
- DOBROVOLJC, K., et al., 2012. Cd, Cu, Zn, Se, and metallothioneins in two amphibians, *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata) and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). *Biological Trace Element Research*, v. 150, p. 178-194. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9461-2>.

- ENDO, T. et al., 2007. Brain regeneration in anuran amphibians. *Japanese Society of Developmental Biologists.*, v. 49, p. 121-129. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00914.x>.
- ETSUO, N., 2009. Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects. Elsevier. v. 47, p. 469-484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>.
- ESTERBAUER, H., et al. 1990. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors, *Mutation Research.* v. 238, p. 223–233. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90014-3).
- FEDOROVA, M. et al., 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom.* v. 33, p. 79–97. <https://doi:10.1002/mas.21381>.
- FENG, G., et al. 2021. Discovery of Antioxidant Peptides from Amphibians: A Review. *Protein and Peptide Letters*, v. 28, p. 1220-1229. <http://dx.doi.org/10.2174/0929866528666210907145634>.
- FAN, J., et al., 2023. The source, distribution, and environmental effects of suspended particulate matter in the Yangtze River System. *Water, Chongqing*, v. 15, p. 34-29. <https://doi.org/10.3390/w15193429>.
- FEDERICI, G., et al., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* v. 84, p. 415-430. <https://doi: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009>.
- FERNANDES, I.F., et al., 2024. Oxidative stress and neurotoxicity induced by exposure to settleable atmospheric particulate matter in bullfrog tadpoles, *Aquarana catesbeiana*, (Shaw, 1802). *Chemosphere*, v. 353, p. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141576>.
- GIROTTO, L., et al., 2020. Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the Dam rupture in Mariana, MG (Brazil). *Water, Air & Soil Pollution* v. 231, p. 1-11. <https://doi.org/ 10.1007/s11270-020-04691-y>.
- GOKUL, et al., 2023. Particulate pollution and its toxicity to fish: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology C.* v. 270, p. 109646. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109646>.
- HALLIWELL, B. 1992. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Free Radicals in the brain*. Springer. v. 1, p. 21-40. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77609-0>.
- HOOK , S. E., et al., 2014 . The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 10, p. 327-341. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ieam.1530>.
- ISLAYEM, D., et al., 2022. Comparison of Colorimetric Methods to Detect Malondialdehyde, A Biomarker of Reactive Oxygen Species. *ChemistrySelect*, v. 7, p. 1-10 <doi.org/10.1002/slct.202103627>.

JIANG, Z.Y., et al., 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, p. 853-856. <https://doi.org/10.1007/bf02536169>.

KRISHNAMURTHY, H. K., et al., 2024. Oxidative stress: fundamentals and advances in quantification techniques. *Frontiers in Chemistry*. v. 12, p. 1470458. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1470458>.

KRUGER, N.J., 1994. The Bradford method for protein quantification. *Methods in Molecular Biology*, v. 32, p. 9-15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:9>.

LEE, JC-Y., et al., 2019. Peroxidação Lipídica: Análise e Aplicações em Sistemas Biológicos. *Antioxidantes* v.8, p.40. <https://doi.org/10.3390/antiox8020040>

LU, J., et al., 2018. The combined toxicity of copper, fluorene and fluoranthene on the antioxidant system and metallothionein expression in *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, v. 200, p. 1-10. doi : 10.1016/j.aquatox.2018.04.008

LOPACHIN, R. M., et al. 2014. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: A chemical perspective. *Chemical Research in Toxicology*, v. 27, p. 1081–1091. <https://doi.org/10.1021/tx5001046>

MARET, W., et al., 1998, Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *PNAS*, v. 95, p. 3478-3482. <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1073/pnas.95.7.3478>.

MOUNAJI, K. et al. (2002). Identification of Metallothionein in *Pleurodeles waltl*. *Z. Naturforsch.* v. 57, p. 727-731.

ORTÍZ, Y. L. S. et al. (2025) The role of amphibian AMPs against oxidative stress and related diseases. *Antibiotics*, v. 14, p. 126. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020126>.

PALMITER, R. D., 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, p. 8428–8430. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8428>

PASCALICCHIO, A.E., 2002. Contaminação por metais pesados: Saúde pública e Medicina ortomolecular. *Anna Blume*, v. 132. p. 121. ISBN 85-7419-245-7.

ROSA, L. F., et al., 2024 Metais pesados no ar atmosférico - Uma revisão teórica. *Environmental Science & Technology Innovation*, v.3, p.167. <https://capela.unisagrado.edu.br/index.php/esti/article/view/781/447>.

SANTOS, J.M., et al., 2017. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 22026-22039. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9677-y>

SHOHAG, M. H., et al., 2022. Perspectives on the Molecular Mediators of Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in the Context of Neuroprotection and Neurolongevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2022/7743705>.

SINNHUBER, R. O., et al., 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity, *Journal of Food Science*. V. 23, pg. 626 – 634. <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1365-2621.1958.tb17614.x>.

SOARES, M. P., et al., 2022. Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Research*, v. 238, p. 117088. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330>.

SOUZA, I. C., et al., 2021. Different trophodynamics between two proximate estuaries with differing degrees of pollution. *Marine Environmental Research*, v. 191, p. 106157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144651>.

VALKO, M., et al., 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current medicinal chemistry*. v.12 p. 1161-128. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867053764635>

VAN DEN HURK, P., et al., 2000. Effects of metals on metallothionein and glutathione levels in aquatic organisms: implications for oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, p. 2852-2859. DOI: 10.1002/etc.5620191212

VAN DER OOST, et al., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149. 10.1016/s1382-6689(02)00126-6.

VERONEZ, A.C.S. et al., 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. et al., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* v. 44, p. 69-84.

VIJAYRAGHAVAN, S., et al., 2023. Aldehyde-associated mutagenesis—Current state of knowledge. *Chemical Research in Toxicology*, v. 36, p. 983–1001. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00045>

YANG. R et al., 2024. Metallothionein: A Comprehensive Review of Its Classification, Structure, Biological Functions, and Applications. *Antioxidants*. v. 29.13, p. 825. <https://doi.org/10.3390/antiox13070825>.