

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

Biomarcadores bioquímicos em fígado de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, como indicadores biológicos de contaminação aquática.

Sorocaba

2020

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

Biomarcadores bioquímicos em fígado de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, como indicadores biológicos de contaminação aquática.

Dissertação 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 Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

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

Sorocaba

2020

Ao meu avô Antônio

AGRADECIMENTO

Á Deus pelo dom da vida, sem Ele nada jamais faria sentido nessa jornada.

Á minha família, em especial meus pais Fabio e Lúcia que me apoiam em todas as decisões e me incentivam a buscar meus sonhos, mesmo nos momentos mais complicados.

Á minha orientadora Prof^ª Dr^ª Cleoni dos Santos Carvalho, pela oportunidade dada com este trabalho, pelos ensinamentos e experiências. Obrigada por me receber tão bem em seu laboratório.

Á técnica Heidi, pela paciência em me ensinar todas as técnicas e manusear os equipamentos, todo o suporte e amizade.

Aos meus companheiros de laboratório, João, Davi, Gabriel e nosso visitante Bruno, obrigada por me ajudarem, pelas conversas, cafés e risadas, não fazemos nada sozinhos nessa vida.

Ás minhas amigas de longa data, Verônica, Luana, Ana Elisa e Ana Beatriz obrigada por me ouvirem falar sobre meu trabalho durante todo esse tempo, mesmo sem entender nada. A amizade de vocês é valiosa.

Aos demais amigos que me apoiaram e torceram para que tudo desse certo durante todo esse período.

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.

*“O cientista não é o homem que fornece as
verdadeiras respostas; é quem faz as
verdadeiras perguntas.”*

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

Diversos contaminantes podem afetar o ecossistema aquático e os organismos que nele vivem e podem interferir nos seus processos fisiológicos, por se acumularem nos diferentes tecidos. Portanto, a avaliação dos efeitos desses contaminantes nos organismos aquáticos contribui para previsibilidade da ação dos diferentes poluentes neste ambiente, gerando informações sobre mecanismos de adaptabilidade frente aos estressores ambientais, por serem utilizados como indicadores de contaminação aquática. Para tanto, o delineamento experimental consistiu em expor durante 96 h girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, a água coletada de dois pontos (P1 e P2) do rio Sorocaba e nos períodos seco (agosto e setembro) e chuvoso (março). Os seguintes parâmetros foram avaliados no fígado: concentração de proteínas (metalotioneína - MT, proteínas carboniladas - PCO) e de (lipoperoxidação lipídica - LPO). Além disso, foram analisados a presença de metais, agroquímicos e fármacos na água e no sedimento nos dois pontos do rio. Nas análises das águas e dos sedimentos não foi detectada a presença de agroquímicos e fármacos; entretanto, foi verificada a presença de metais em ambos os pontos e nos dois períodos. A presença de metais aumentou significativamente a MT e a PCO no fígado de girinos expostos à água no P1 e no P2 e no período chuvoso, enquanto no período seco, a concentração da PCO e LPO aumentaram significativamente no fígado dos girinos expostos a água do P1 e P2, respectivamente. Esses resultados indicam um quadro de estresse oxidativo pela presença dos metais na água e sugere que esses animais foram capazes de alterar as vias metabólicas por processos de desintoxicação. Portanto, esses resultados demonstraram que os biomarcadores de efeito propostos podem ser bons indicadores de contaminação aquática em girinos de rãs-touro.

Palavras-chave: xenobióticos, tecidos, estresse oxidativo, anfíbios

ABSTRACT

Various contaminants can affect the aquatic ecosystem and the organisms that live in it and can interfere with their physiological processes, as they accumulate in different tissues. Therefore, the evaluation of the effects of these contaminants on aquatic organisms contributes to the predictability of the action of different pollutants in this environment, generating information on mechanisms of adaptability to environmental stressors, as they are used as indicators of aquatic contamination. For this purpose, the experimental design consisted of exposing for 96 h bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, the water collected from two points (P1 and P2) of the Sorocaba River and in the dry (August and September) and rainy (March) periods. The following parameters were evaluated in the liver: protein concentration (metallothionein - MT, carbonyl proteins - PCO) and (lipid lipoperoxidation - OPL). In addition, the presence of metals, agrochemicals and drugs in the water and sediment at both points of the river were analyzed. In the analysis of water and sediment, the presence of agrochemicals and drugs was not detected; however, the presence of metals was verified at both points and in both periods. The presence of metals significantly increased MT and PCO in the liver of tadpoles exposed to water in P1 and P2 and in the rainy season, while in the dry period, the concentration of PCO and OLP significantly increased in the liver of tadpoles exposed to water from P1 and P2, respectively. These results indicate a picture of oxidative stress by the presence of metals in the water and suggests that these animals were able to alter the metabolic pathways for detoxification processes. Therefore, these results demonstrated that the proposed effect biomarkers can be good indicators of aquatic contamination in bullfrog tadpoles.

Keywords: xenobiotics, tissues, oxidative stress, amphibians

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Artigos relacionados a temática de biomarcadores e anfíbios anura. B = biomakers; BB = biomakers biochemichal; BBA = biomakers biochemichal anura; BBA Tad. = biomakers biochemichal anura tadpole; BBAT. BF = biomakers biochemichal anura tadpole bullfrog	16
Figura 2 – Número de artigos com os termos da temática, em quatro plataformas distintas	17
Figura 3 – Cronologia de artigos publicados relacionados a temática, dentro da plataforma PubMed	17
Figura 4 – Expressão da Metalotioneína (MT). ROS = Espécies Reativas de Oxigênio; MTF-1 = Fator de Transcrição de Metais 1; MRE = Elemento de Resposta a Metais; ARE = Elemento de Resposta a Antioxidante; MT = Metalotioneína; Cd = Cádmio; Cu = Cobre; Hg = Mercúrio; Zn = Zinco	24
Figura 5 – Formação de grupos carbonila	25
Figura 6 – Etapas da Lipoperoxidação (LPO)	27
Figura 7 – Espécies de anfíbios em escala global	30
Figura 8 – Ciclo de vida do anfíbio	31
Figura 9 – Fêmea de rã-touro, <i>Lithobates catesbeianus</i>	33
Figura 10 – Organização interna do girino de <i>L. catesbeianus</i> (1), focinho (2), brânquia (3), coração (4), fígado (5), intestino (6), cauda (7)	34
Figura 11 – Girino de rã-touro, <i>Lithobates catesbeianus</i> ., A - Girino visto lateralmente; B – Focinho e olhos do girino; C – Medida do girino	35
Figura 12 - Mapa de localização da bacia do Alto Sorocaba	37
Figura 13 – A. Aquários grupo controle; B. Aquários contendo água do Rio Sorocaba do ponto 1; C. Aquários contendo água do Rio Sorocaba do ponto 2	40
Figura 14 – Esquema da análise de MT	43
Figura 15 – Esquema para Análise da PCO	44
Figura 16 – Esquema para Análise de LPO	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração dos metais	29
Tabela 2 – Família dos Anuros	33
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos e valores médios dos contaminantes químicos analisados no período chuvoso (março) nas amostras de água superficial (P1 e P2). *indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo período; # indica diferença significativa em relação aos P1 e P2. LQ = limite de quantificação; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição	49
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e valores médios dos contaminantes químicos analisados no período seco (agosto) nas amostras de água superficial (P1 e P2). *indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo período; # indica diferença significativa em relação aos P1 e P2. LQ = limite de quantificação; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição	49
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos e valores médios dos contaminantes químicos analisados no período chuvoso (março) e seco (agosto) nas duas amostras de sedimento (P1 e P2) e o limite estabelecido pela resolução CONAMA 454/12. *indica diferença significativa em relação ao P1; #indica diferença significativa em relação aos P1 e P2 entre os períodos março e agosto. LQ = limite de quantificação	52
Tabela 6 - Concentração de metalotioneína (MT), de proteínas carboniladas (PCO) e de peroxidação lipídica (LPO) no fígado de <i>L. catesbeianus</i> , para os períodos chuvoso e seco. Os valores são representados como média ± D.P.M. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle; # indica diferença significativa em relação aos pontos 1 e 2 ($p < 0,05$); ^a indica diferença significativa em relação ao período chuvoso. n = 8	55

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE – 4-hidroxinonenal

AGPI – Ácido Graxo Poli-insaturado

Al – Alumínio

ARE – Elemento de Resposta a Antioxidante

As – Arsênio

ASTM – American Society for testing and materials

BHT – hidroxitolueno butilado

CAT – catalase

Cd – Cádmió

CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa

CH₂ – radical metileno

Co – Cobalto

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr – Cromo

Cu – Cobre

Cys – Cisteína

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNFH – 2,4 – dinitrofenil hidrazina

DTNB – Ácido 5,5' – ditiobis-2-nitrobenzoico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe – Ferro

GPx – glutationa peroxidase

GSH – Glutationa Reduzida

H₂O – Água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

Hg – Mercúrio

HP – hidroperóxido de lipídeos

KCl – Cloreto de potássio

KHPO₄ – Fosfato de potássio monobásico

L – radical alquila

LABioM – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia

LO – radical alcoxila

LOO – radical peroxila

LOOH – Hidroperóxido lipídico

LPO – Lipoperoxidação

LQ – Limite de Quantificação

MDA – Malondialdeído

Me – Metal

Mg – Magnésio

Mn – Manganês

MRE – Elemento de Resposta a Metais

MT – Metalotioneína

MTF-1 – Fator de Transcrição de metais 1

Na₂HPO₄(7H₂O) – Fosfato de sódio dibásico

NaCl – Cloreto de sódio

Ni – Níquel

O₂⁻ - ânion superóxido

OH – radical hidroxil

P1 – Ponto 1 – Rio Una

P2 – Ponto 2 – Represa de Itupararanga

Pb – Chumbo

PBS – Tampão Fosfato Salina

PCO – Proteínas Carboniladas

-SH – grupamento sulfidrila

SMT – Sorocaba Médio Tietê

SOD – superóxido desmutase

TBARs – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrtico

TCA – Ácido Tricloroacético

Zn – Zinco

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Justificativa	16
2. Objetivos e hipóteses	19
3. Fundamento teórico	20
3.1 Ecotoxicologia	20
3.2 Biomarcadores	21
3.2.1 Biomarcadores Bioquímicos	22
3.2.2 Metalotioneína (MT)	23
3.2.3 Proteínas Carboniladas (PCO)	25
3.2.4 Lipoperoxidação (LPO)	26
3.3 Contaminantes e Contaminação Aquática	28
3.4 Modelo Experimental	30
3.4.1 Anfíbios	30
3.4.2 Anuros	32
3.4.3 <i>Lithobates catesbeianus</i> (SHAW, 1802)	34
3.5 Caracterização do ambiente	36
3.5.1 Bacia Alto Sorocaba	37
4. Materiais e Métodos	39
4.2 Coleta e manutenção dos animais em Laboratório	39
4.3 Análises da água e do sedimento	41
4.4 Análises bioquímicas	41
4.4.1 Obtenção do homogenizado	41
4.4.2 Quantificação de Proteínas	42
4.4.3 Quantificação de Metalotioneína (MT)	42
4.4.4 Quantificação de Proteínas Carboniladas (PCO)	43
4.4.5 Quantificação de LPO	44
4.5 Procedimento estatístico	45
5 Resultados e Discussão	46
5.1 Água e Sedimento	46
6 Conclusões	60
6 Referência	61
ANEXO 1	81

1. Introdução

A humanidade historicamente se desenvolveu entorno de cursos d'água, pois serviam como forma de utilização das atividades mais básicas, como produção de alimentos e limpeza, além de serem utilizadas como meio de transporte. Mais tarde, com a evolução de técnicas e a industrialização, esses corpos d'água passaram a ser utilizados para a produção de energia, como agente em processos tecnológicos e produtivos e, com as ações agrícolas, passaram a ser utilizados como fonte para irrigação (PEDRAZZI, 2014).

A partir da Declaração Universal dos Direitos da Água que estabelece que “a água é a seiva do nosso planeta, é condição essencial de vida de todo animal, vegetal ou ser humano”, foi reconhecida sua extrema importância. $\frac{3}{4}$ do planeta é recoberto por água e apenas 2,5% de água doce passível de utilização humana, sendo que nos últimos 50 anos essa disponibilidade vem diminuindo (CONSTANTINOV, 2010). Até 2050, a água disponível não suprirá as necessidades humanas, ou seja, o número de habitantes será muito maior que a disponibilidade de água (SEGALA, 2012).

Se não bastasse a grande utilização dos recursos hídricos em diversas cidades e sua disponibilidade, os efluentes domésticos, industriais e agrícolas são descarregados sem tratamento ideal, em rios, lagos e reservatórios (FRANCO *et al.*, 2010). Os compostos químicos que podem estar presentes no ambiente aquático, são denominados xenobióticos, que são substâncias estranhas aos organismos, tendo como exemplos os metais, compostos orgânicos persistentes, hidrocarbonetos, pesticidas, detergentes, medicamentos e a combinação destes compostos (LAM, 2009). Os quais podem ser absorvidos pelos tecidos dos vertebrados e invertebrados por várias rotas (respiração, adsorção e/ou alimentação), podem se bioacumular em tecidos e órgãos e também participar de reações químicas dentro das células, gerando variações metabólicas, enzimáticas e/ou genéticas (BELGIORNO, 2007).

A determinação dessas variações pode ser uma ferramenta importante para detectar o impacto ambiental nos organismos (COSTA *et al.*, 2008, RUAS *et al.*, 2008, CARVALHO *et al.*, 2012, SAKURAGUI *et al.*, 2013). Portanto, os testes de toxicidade aquática têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de efeitos tóxicos, letais ou não, de grande interferência nos organismos aquáticos em virtude, principalmente, do potencial risco da transferência de poluentes do ambiente para os organismos e a avaliação da qualidade da água (CETESB, 1999; FERREIRA, 2002; MARCANTONIO *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2017).

O contaminante em contato com o organismo pode iniciar um processo fisiopatológico que pode gerar o estresse oxidativo, que ocorre em situações em que há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e sua eliminação

do metabolismo pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes nos organismos (AHMAD *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2010; LUSHCHAK, 2014). Tanto as EROs como as ERNs desempenham papel fisiológico no organismo, como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose e na resposta imunológica a agentes patogênicos (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Desse modo, tem crescido a preocupação com o diagnóstico precoce da contaminação, onde um planejamento de controle ambiental poderia vir antes do problema atingir grandes proporções. Uma maneira de se realizar este diagnóstico precoce é o biomonitoramento, no qual variados organismos são utilizados como indicadores da qualidade ambiental (SANTOS, 2013).

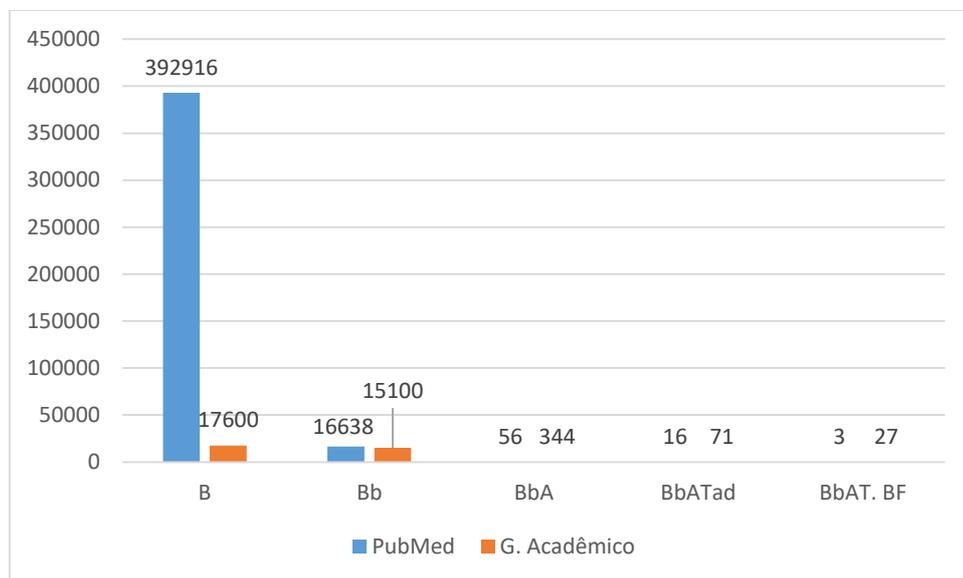
Os anfíbios são considerados bons bioindicadores de poluição ambiental por exercerem importante papel nos ecossistemas aquáticos, por terem em geral seu ciclo de vida na água, quando girinos e na água e/ou na terra, após sofrerem metamorfose, e também por serem sensíveis a alterações no meio (SCHUYTEMA *et al.*, 1991; BURGER; SNODGRASS, 2001, HADDAD, 2008). Esses animais são encontrados nos mais diferenciados tipos de ambientes como riachos, lagoas, brejos, poças permanentes e temporárias ou na serapilheira no interior de florestas (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Além disso, vários estudos mostram a relação entre a diminuição das populações de anfíbios e o uso de agroquímicos e outros tipos de compostos, incluindo pesticidas e fertilizantes no ambiente aquático (PELTZER *et al.*, 2008, JONES *et al.*, 2009, RELYEA *et al.*, 2009, PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015, SOLONESKI *et al.*, 2016).

No ambiente e em contato com os organismos os contaminantes podem ser absorvidos e distribuídos aos dois principais órgãos de desintoxicação, o fígado e o rim. O fígado é um órgão fundamental no metabolismo, desintoxicação e biotransformação de xenobióticos e é indicado para avaliação da resposta de exposição a poluentes ambientais em vertebrados (LUCIA *et al.*, 2010, THIRUMAVALAVAN, 2010). Esse órgão possui grande suprimento sanguíneo, além de alta capacidade metabólica (HINTON, *et al.*, 2001) e desempenha um papel fundamental na biotransformação dos xenobióticos. Quando um composto é excretado diretamente na bile em processos de desintoxicação ele pode ser reabsorvido no intestino delgado ou eliminado pelas fezes (BOENING, 2000).

1.1 Justificativa

A partir do estudo de biomarcadores bioquímicos de contaminação, os anfíbios podem servir como indicadores da presença de praguicidas e contaminantes em geral no ambiente aquático (RELYEA 2005, 2006; RELYEA et al., 2005). Entretanto, a literatura apresenta escassez de estudos relacionados à avaliação de biomarcadores de contaminação ambiental em anfíbios, como pode ser visto na Figura 1.

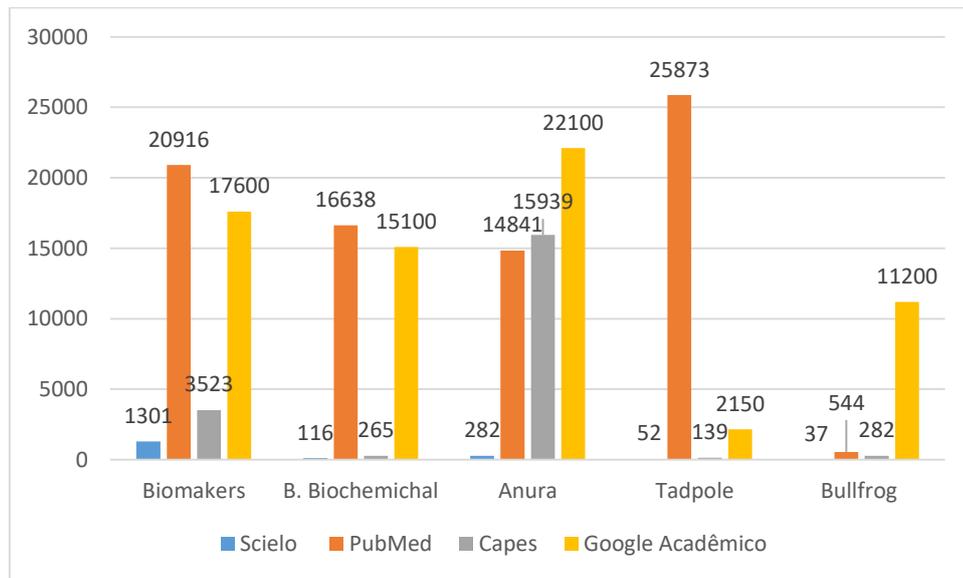
Figura 1 – Artigos relacionados a temática de biomarcadores e anfíbios anura. B = biomakers; BB = biomakers biochemichal; BBA = biomakers biochemichal anura; BBA Tad. = biomakers biochemichal anura tadpole; BBAT. BF = biomakers biochemichal anura tadpole bullfrog.



Fonte: Autora

Neste caso a pesquisa abrangeu os anos de 2010 a 2019, com os termos buscados em quatro plataformas diferentes, Scielo, PubMed, Periódicos da Capes e Google Acadêmico. Com os termos combinados apenas em duas plataformas são encontrados artigos, sendo três no PubMed e 27 no Google Acadêmico (AVERYHART-FULLARD; JAFFE, 1990; DORNELLES, OLIVEIRA, 2013, VERONEZ et al, 2016). Porém, quando os termos são buscados separadamente são encontrados em abundância, como visto na Figura 2, em todas as plataformas utilizadas. Fazendo uma conexão entre as figuras nota-se o grande número de estudos em cada setor, visto que os anfíbios, por exemplo, são amplamente estudados por sua metamorfose, metabolismo e morfologia, o mesmo para cada um dos demais termos, mas quando combinados são escassos, o que corrobora com a relevância desse estudo.

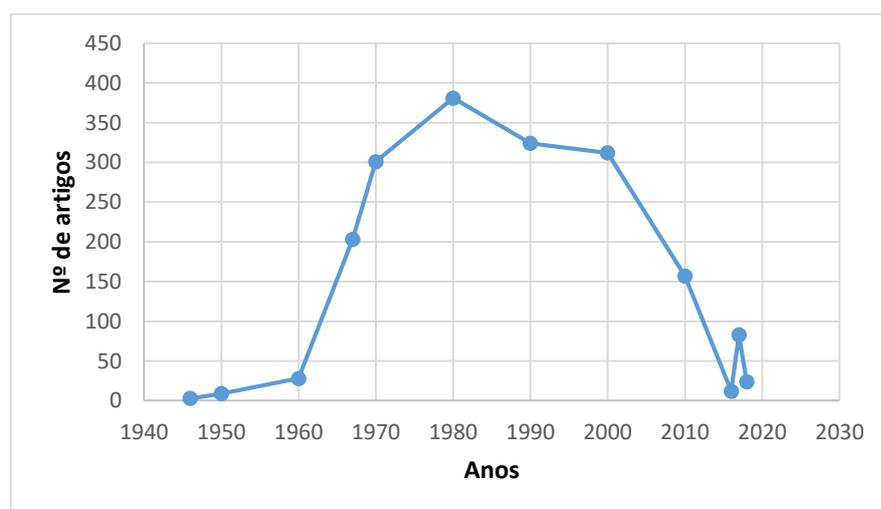
Figura 2 – Número de artigos com os termos da temática, em quatro plataformas distintas (*Para o termo Biomarker, na plataforma PubMed há mais de 20916 artigos).



Fonte: Autora

A figura 3 apresenta uma cronologia em relação ao número de artigos publicados por ano. As pesquisas com anfíbios anuros tiveram início a partir da década de 40 utilizando metais como contaminante e seguem até metade do ano de 2018. No gráfico nota-se que houve um pico nas publicações na década de 80, seguido por um declínio acentuado nas publicações desde esta época. O menor número de publicações ocorreu no ano de 2016.

Figura 3 – Cronologia de artigos publicados relacionados a temática, dentro da plataforma PubMed.



Fonte: Autora

Nesse sentido, é de interesse científico aumentar o número de estudos e publicações com esses temas, visto que essa classe de animais, apesar de populosa, tem decaído devido à ação antrópica, mudanças climáticas, perda do habitat e radiações ultravioleta (AWKERMAN, 2019). Assim, as questões a serem abordadas nesta pesquisa são: o rio Sorocaba contém os compostos químicos metais, agroquímicos e fármacos? Esses compostos químicos estão presentes em concentrações acima da permitida pela resolução 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para águas de Classe 2? A presença desses compostos químicos pode causar alterações na sua fisiologia e comprometer o desenvolvimento de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*?

2. Objetivos e hipóteses

Este estudo se concentra em entender como a exposição à água do rio Sorocaba afeta os girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Nosso principal objetivo é avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) a água do rio Sorocaba sobre o fígado de girinos de rãs-touro utilizando biomarcadores bioquímicos em duas épocas do ano, chuvosa (março) e seca (agosto).

Especificamente, nossas hipóteses são as seguintes: (1) o rio Sorocaba contém os compostos químicos: metais (Zn, Cu, Al, Cd e Mn), agrotóxicos (herbicidas: glifosato, atrazina e dos inseticidas: metamidofós e endosulfan) e os fármacos (diclofenaco e paracetamol) e estes compostos químicos estão presentes em concentrações acima da permitida pela resolução 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para águas de Classe 2; (2) os compostos químicos variam sazonalmente; (3) a presença destes compostos altera os biomarcadores bioquímicos: metalotioneína (MT), proteínas carbonilas (PCO) e causa lipoperoxidação (LPO) no fígado de girinos de rãs-touro.

Para testar nossas hipóteses as ações são:

(a) verificar a presença e determinar a concentração de metais, agroquímicos e fármacos na água e no sedimento do rio Sorocaba em dois pontos (P1 e P2) e em períodos seco e chuvoso;

(b) comparar a presença destes compostos químicos com o período chuvoso (março) e seco (agosto);

(c) determinar a concentração de MT, PCO e LPO no fígado de girinos de rãs-touro expostos a água do rio Sorocaba;

(d) verificar se esses biomarcadores bioquímicos podem ser utilizados como indicadores biológicos de contaminação aquática;

(e) comparar os diferentes biomarcadores e definir quais são relevantes para cada tipo de contaminação.

3. Fundamento teórico

3.1 Ecotoxicologia

De acordo com Soares (1990):

“A necessidade em monitorar o espectro dos efeitos de ações antrópicas sobre os diferentes ecossistemas levou à criação da Ecotoxicologia, ciência que estuda os efeitos de agentes químicos tóxicos em nível de indivíduo, e suas consequências na estrutura e funcionamento das populações, comunidades e ecossistemas” (Soares, 1990, p.43-52).

A liberação excessiva de contaminantes químicos que causam toxicidade no ambiente e afeta a biota onde são liberados é o foco da ecotoxicologia. Com isso, esses contaminantes representam um problema que exige uma regulamentação para atenuar os prováveis impactos no ambiente (CHAPMAN, 1995).

A partir dos anos 80, o desenvolvimento e aplicação de biomarcadores para o uso em ecotoxicologia e avaliação de risco ecológico aumentou consideravelmente, visto que as preocupações com o ambiente também cresceram (FORBES; PALMQVIST; BACH, 2006). Os biomarcadores que refletem perturbações do metabolismo, como os radicais livres, são de primordial importância em aplicações ecotoxicológicas. Isto porque todas as principais classes de poluentes ambientais, por diferentes caminhos, podem alterar o equilíbrio natural entre as forças pró-oxidantes e as defesas antioxidantes, aumentando a formação de EROs e reduzindo a eficiência antioxidante (BENEDETTI, *et al.*, 2015).

A utilização dos biomarcadores para ensaios ecotoxicológicos, permite aos pesquisadores determinar o quanto uma substância que interage com os organismos testes são tóxicas, a partir do número de mortes, descendentes e tamanho corporal, entre outras variáveis (SARMA; NANDINI, 2006). O ambiente aquático é dinâmico e diverso. As propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos podem afetar significativamente a atividade biológica e o impacto dos agentes químicos e outros xenobióticos. Portanto, os testes de diferentes concentrações de um ou mais agentes nocivos em laboratórios e em organismos representativos do ecossistema aquático permite controlar os parâmetros físico e químico da água por um período de tempo pré-determinado. Com esses ensaios é possível controlar temperatura, iluminação, contaminação, agentes externos que são passíveis de controle, ou seja, as condições ambientais em que os organismos são mantidos. Os ensaios são classificados de acordo com a duração como ensaios agudos ou crônicos e de acordo com o método de se adicionar a solução teste, em estático, semi-estático e fluxo contínuo.

No ensaio agudo o efeito observado é de curta duração, geralmente em intervalo de 0-96h, em relação ao período de vida do organismo-teste. No ensaio agudo é observada a mortalidade ou outra manifestação do organismo, enquanto que o crônico os testes são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. Este ensaio analisa o efeito de longa duração da substância no organismo como mudança do metabolismo, crescimento, reprodução, mutação e até mesmo a morte do organismo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2014). Já os ensaios estáticos são realizados sem renovação das soluções-testes e são recomendados para amostras que não causam depleção de oxigênio, que não são voláteis e que são estáveis em meio aquoso (American Public Health Association, 1998; ABNT, 2004). Os testes semi-estáticos, as soluções-testes são renovadas periodicamente e dependerá da espécie de organismo-teste (American Public Health Association, 1998; KENDALL *et al.*, 2001). Enquanto nos testes dinâmicos as soluções-testes são continuamente renovadas e são utilizados nos ensaios crônicos (KENDALL *et al.*, 2001; ADAMS, ROWLAND, 2003).

As pesquisas que usaram testes ecotoxicológicos no Brasil avançaram consideravelmente no período entre 2000 e 2011 (MARTINS; BIANCHINI, 2011; KRULL; BARROS, 2012), a maioria destes estudos foi realizado no Sul e Sudeste do país, principalmente ao avaliar a toxicidade de metais e pesticidas em meio aquoso (SARMA, NANDINI, 2006; COSTA *et al.*, 2008).

3.2 Biomarcadores

O conceito de biomarcadores foi definido, segundo Walker *et al.* (2012), como toda resposta biológica que os organismos vivos expressam quando estão expostos a um ou vários compostos químicos orgânicos ou inorgânicos (xenobióticos), sendo que esta resposta expressa o grau de exposição e/ou o efeito que estes xenobióticos causam sobre os organismos. Também podem ser definidos como alterações no nível sub-individual dos bioindicadores, organismos utilizados, passíveis de serem atribuídas a uma mudança considerável no ambiente (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). Essas alterações podem ser observadas em diversos níveis como: molecular, bioquímico, fisiológico e morfológico, podendo representar sinais precoces da exposição a contaminantes (VAN DER OOST, *et al.*, 2003, NOGUEIRA *et al.*, 2008, SILVA, 2016, AMARAL *et al.*, 2017). Já segundo Oliveira (2014), os biomarcadores são definidos, em termos ecotoxicológicos, como uma alteração em resposta biológica que reflete os efeitos tóxicos de substâncias químicas.

Entre os inúmeros biomarcadores ecotoxicológicos propostos, aqueles baseados na resposta ao nível molecular, bioquímico e celular traduzem respostas sobre os primeiros sinais de estresse ambiental. Além de ser em uma ferramenta sensível de alerta para os efeitos biológicos medidos em avaliações da qualidade ambiental, podendo ser usados de forma a antecipar o acontecimento de danos ecológicos irreversíveis ou consequências severas, permitem que sejam tomadas medidas de biorremediação (SILVA, 2013).

Os biomarcadores têm sido classificados em três grandes categorias (SOGORB *et al.*, 2014): os biomarcadores de exposição, para determinar se um organismo foi exposto a um dado xenobiótico, os biomarcadores de efeito, para determinar o efeito ou resposta do organismo exposto ao xenobiótico e os biomarcadores de suscetibilidade, para prever a suscetibilidade ou resistência do organismo face aos efeitos nocivos de um xenobiótico particular.

A relação entre as respostas de cada um dos biomarcadores permite elucidar informações sobre o potencial tóxico de diversas classes de contaminantes. Por exemplo, sabe-se que existe relação direta entre a indução do estresse oxidativo e danos genéticos (YU *et al.*, 2016). O estresse oxidativo também pode induzir à peroxidação lipídica e danos em proteínas celulares (JOMOVA; VALKO, 2011); portanto, por meio da resposta de biomarcadores combinados é possível identificar os danos causados pelos compostos ou metabólitos (WINSTON; DI GIULIO, 1991; ZORITA *et al.*, 2008).

Os aspectos moleculares e bioquímicos são os primeiros a serem alterados quando um xenobiótico entra em contato com o organismo (ISLA, 2016). Portanto, essa resposta poderia ser considerada como um alerta precoce do risco desses contaminantes no interior dos organismos expostos (ATLI, CANLI, 2010; FRANCO *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012; KUBOTA *et al.*, 2013).

3.2.1 Biomarcadores Bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos são normalmente os primeiros sinais de alterações biológicas a serem detectadas em razão da presença de poluentes. Além disso, são sensíveis a várias classes de poluentes, apresentam alta especificidade e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (VAN DER OOST *et al.*, 2003, AITIO *et al.*, 2007; NORDBERG, 2010; ALIJANI *et al.*, 2017).

Dentre os sistemas bioquímicos mais recomendados como biomarcadores de contaminação ambiental, destacam-se aqueles que levam os organismos a uma situação de estresse oxidativo, uma vez que a biotransformação de xenobióticos é tipicamente acompanhada de uma superprodução de EROs, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$),

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\bullet) (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998; LÓPEZ-BAREA, 2000) e, no caso das ERNs, destacam-se o óxido nítrico (ON^\bullet) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (KEHRER, 2000; DIKALOV et al., 2007; KANTI DAS et al., 2015). Esses radicais levam a alterações celulares e enzimáticas, que apresentam sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas (SCHLENK *et al.*, 1999). Essas alterações são as primeiras respostas detectadas frente à variação ambiental. Por isso, biomarcadores bioquímicos são frequentemente mais sensíveis que outros em níveis mais elevados de organização biológica, como células, tecidos, órgãos, organismos e populações (SCHLENK *et al.*, 2008).

Em sequência são apresentados os biomarcadores que foram abordados neste estudo:

3.2.2 Metalotioneína (MT)

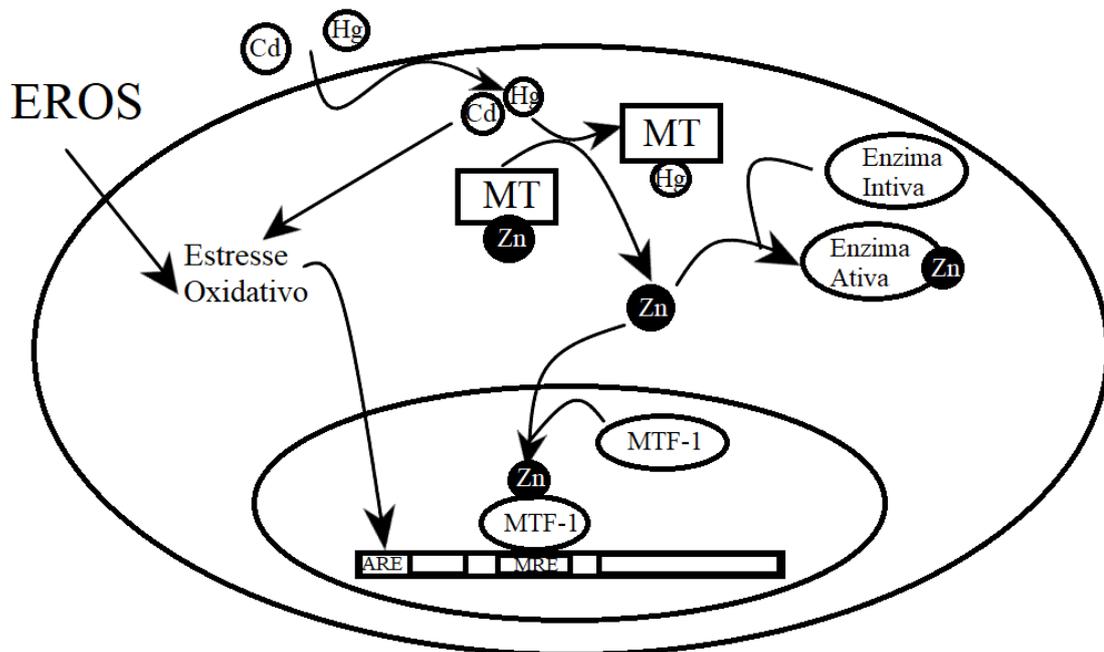
As metalotioneínas (MTs) foram descobertas em 1957 quando Margoshes e Vallee identificaram em rim equino uma proteína responsável pelo acúmulo natural de cádmio (Cd). Desde então, as MTs são os únicos compostos biológicos conhecidos por conter naturalmente Cd (MARGOSHES; VALLEE, 1957). A nomenclatura da proteína foi baseada na observação de algumas características particulares, como elevada quantidade de enxofre e presença de metais como Cd e zinco (Zn). A característica comum de todas as MTs é a ocorrência da sequência de tripeptídeos Cys-X-Cys, onde X representa um aminoácido diferente de cisteína (Cys) (NORDBERG, 1998).

A função fundamental das MTs nos sistemas vivos ainda não foi bem esclarecida, embora existam várias hipóteses, que atuam como metalochaperonas (MARET, 1995; JACOB *et al.*, 1998; MUTO *et al.*, 1999). Essa proteína atua no transporte de íons metálicos para outras proteínas, no controle da concentração de elementos traços livres como Zn e cobre (Cu), na ação como agente de desintoxicação aos metais como Cd e mercúrio (Hg), e também no papel protetor da célula por sequestro de metais e proteção contra condições de estresse (NORDBERG, 1998; CHERIAN *et al.*, 2003; VASÀK, 2005). Por isso, a MT é uma proteína importante no metabolismo intracelular de Cu e Zn e na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a metais (MUTO *et al.*, 1999, CARVALHO *et al.*, 2017).

Como mostra a Figura 4, quando há entrada de um metal no organismo, sendo ele essencial ou não, a MT é ativada. Essa proteína, na sua forma inativa, está ligada a íons Zn. O Zn se desliga da MT deixando-a livre para se ligar aos metais pela porção $-SH$ (sulfidril), neste caso, representados na figura pelos Cd e Hg. A MT ligada aos metais impede que estes participem de reações dentro do organismo e causem efeitos tóxicos (HAQ *et al.*, 2003). A expressão da MT

pode também ser ativada pelo estresse oxidativo por aumentar indiretamente o Zn que, desligado da MT, atua no gene responsável pela transcrição da tioneína (MTF-1). Dessa forma, ocorre um aumento considerável na concentração de glutatona reduzida (GSH) e/ou da MT para combater o estresse oxidativo causado pelo metal (CHERIAN *et al.*, 2003; HAQ *et al.*, 2003; VÁSAK, 2005).

Figura 4 – Expressão da Metalotioneína (MT). EROS = Espécies Reativas de Oxigênio; MTF-1 = Fator de Transcrição de Metais 1; MRE = Elemento de Resposta a Metais; ARE = Elemento de Resposta a Antioxidante; MT = Metalotioneína; Cd = Cádmio; Cu = Cobre; Hg = Mercúrio; Zn = Zinco.



Fonte: Baseado em HAQ *et al.*, 2003

A avaliação da regulação da expressão gênica evidenciou que a indução da síntese de MTs por metais é uma resposta ao aumento da concentração do metal dentro da célula (CHERIAN *et al.*, 2003; VÁSAK, 2005). Em relação aos organismos aquáticos, os estudos para estabelecer a função das MTs têm focado no seu potencial de redução da toxicidade de metais (INACIO, 2006; CARVALHO *et al.*, 2017). A indução de MT resulta em aumento da ligação de metais à proteína e esta capacidade de indução torna-se maior nos órgãos envolvidos na captação, acúmulo e excreção como fígado, rins, brânquias e intestino (BRZÓSKA, MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001; CARVALHO *et al.*, 2004). Entretanto, as concentrações dessa proteína podem variar de acordo com a espécie, condições reprodutivas, idade e dieta alimentar, por exemplo (VASAK, HASLER, 2000). Por isso, diferentes espécies mostram diferenças nos níveis de MTs e diferentes órgãos acumulam metais em proporções distintas devido as características de suas funções bioquímicas e fisiológicas e rotas de exposição (INACIO, 2006; CARVALHO *et al.*, 2017). Portanto, embora

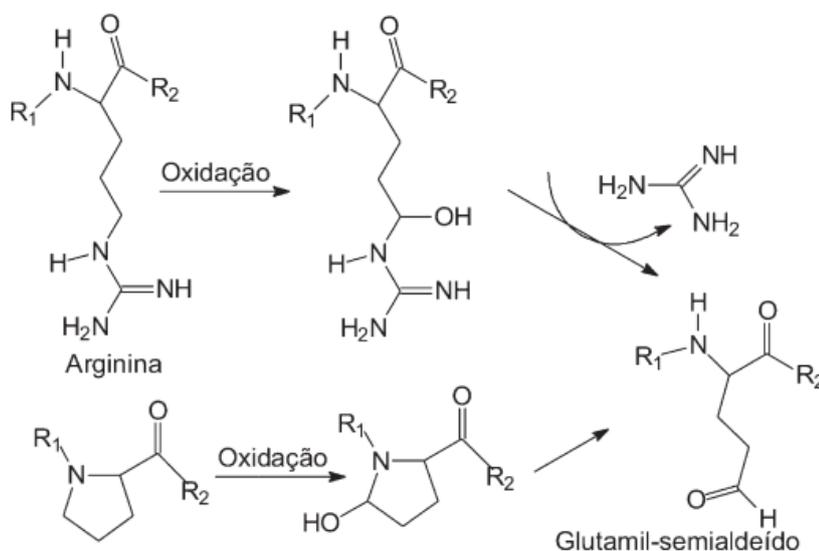
seja esperado que o fígado apresente os maiores níveis de MTs, estudos mostram que estes valores podem variar nos organismos (FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003).

Por ser considerado um biomarcador específico para a exposição aos metais, a MT tem sido utilizada frequentemente em estudos relacionados a estes contaminantes (BRZÓSKA, MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001; CARVALHO *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2017). Além disso, essas proteínas também podem ser utilizadas como marcadores de estresse oxidativo e não somente pela presença de metais, mas de outros xenobióticos, devido a nucleofilicidade dos seus grupos sulfidrilas (VIARENGO *et al.*, 2000).

3.2.3 Proteínas Carboniladas (PCO)

A introdução de grupos carbonila (C=O), grupo funcional constituído de um átomo de carbono ligado por ligação dupla a um átomo de oxigênio, nos resíduos de aminoácidos é uma característica de modificações oxidativas. Por isso, a reação dos grupos carbonila com reagentes específicos, os aminoácidos, por exemplo, é uma forma eficiente de inferir se está ocorrendo dano oxidativo em proteínas (LEVINE *et al.*, 1990; THÉRON D *et al.*, 2000; REQUENA *et al.*, 2003). Sendo assim, a carbonilação de um resíduo pode ser suficientemente severa para causar a perda funcional de uma proteína, como acontece quando a oxidação de um dos resíduos resulta na sua inativação (LEVINE, 1983). A figura 5 mostra os processos de formação de grupos carbonila por oxidação de aminoácidos.

Figura 5 – Formação de grupos carbonila.



Fonte: VASCONCELOS *et al.*, 2007.

Os aminoácidos aromáticos como lisina, arginina, prolina e treonina são os alvos principais do ataque das EROs, mas todos os aminoácidos são susceptíveis à oxidação. A carbonilação de proteínas ocorre como resultado da ação de produtos de lipoperoxidação avançada, como malondialdeído (MDA), glioxal, acroleína e 4-hidroxinonenal (4-HNE), e de produtos de glicação avançada, como glioxal e metilglioxal, sobre sítios nucleofílicos de aminofosfolipídeos, peptídeos e proteínas (cisteína, lisina e histidina) e de DNA (THÉROND *et al.*, 2000; PACHER, BECKMAN *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2010). As proteínas também podem sofrer danos oxidativos por meio de diversas reações. O radical hidroxila pode remover um hidrogênio de um aminoácido, formando um radical de carbono, o qual pode levar à clivagem de ligações peptídicas. Se forem gerados dois ou mais radicais, pode ocorrer ainda a formação de *crosslinks* na proteína, tornando-a resistente à degradação proteossômica e podendo até inibir sua atividade (SMART; HODGSON, 2008).

Portanto, níveis elevados de proteínas carboniladas são geralmente sinal de elevados níveis de estresse oxidativo (DALLE-DONNE *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2010), mostrando um resultado integrado do dano oxidativo (STADTMAN *et al.*, 2000). Além disso, a oxidação dos aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina pode resultar na formação de carbonilas protéicas, as quais também podem ser introduzidas nas proteínas por reações com aldeídos provenientes da LPO (BERLETT; STADTMAN, 1997). A formação de PCO, na presença de contaminantes químicos tem atraído grande atenção devido a sua natureza irreversível e irreparável (MONTEIRO *et al.*, 2010; CALAPOGLU *et al.*, 2017) e, portanto, pode ser utilizada como referência do índice de estresse oxidante em girinos de rãs-touro.

3.2.4 Lipoperoxidação (LPO)

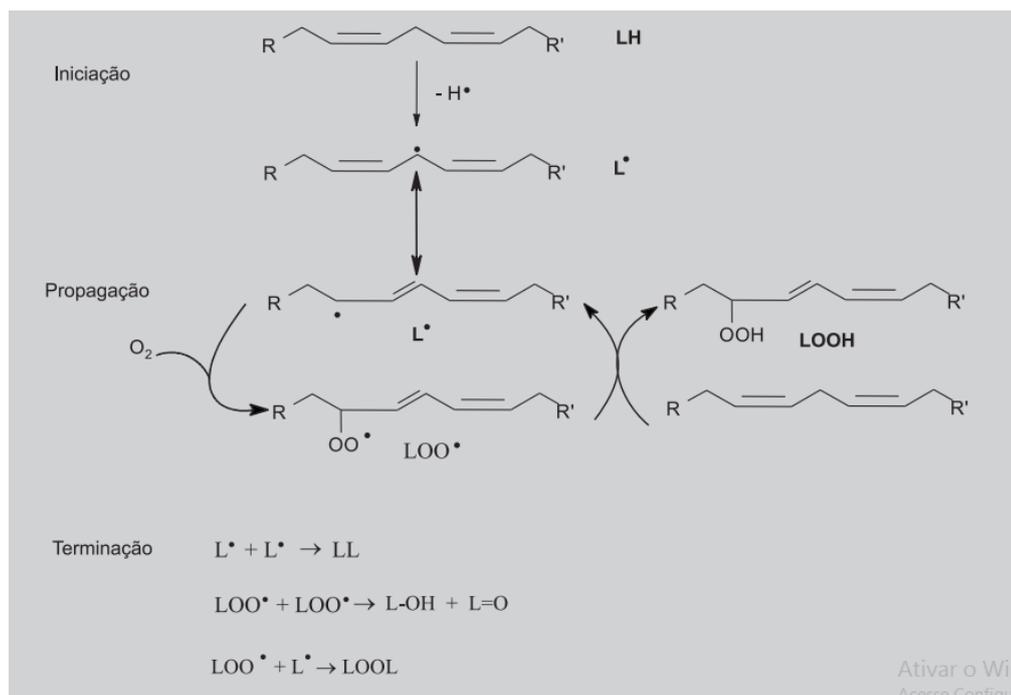
A reação de EROs e de ERNs com ácidos graxos poliinsaturados inicia o processo em cadeia definido como lipoperoxidação (LPO) ou peroxidação lipídica. As EROs incluem também os radicais alquila (L[•]), alcoxila (LO[•]) e peroxila (LOO[•]) e as ERNs destacam-se o óxido nítrico (ON[•]) e o peroxinitrito (ONOO[•]) (BARBER, BERNHEIM, 1967; CHANGE, SIES, BOVERIS, 1979; KANTI DAS *et al.*, 2015).

A produção de LPO tem sido relatada como a maior contribuidora para a perda da função celular sob estresse oxidativo (STOREY, 1996); portanto, pode ser um indicador de estresse oxidativo celular. Vários estudos demonstraram a indução de LPO como medida de estresse oxidativo induzido por xenobióticos como, por exemplo, os metais (VALAVANIDIS *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2011; DOMINGUES, 2015; LOZI, 2019).

Basicamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado (AGPI) nas membranas das células e/ou organelas, para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias: (i) uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI e (ii) a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de EROs, ERNs, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHDI *et al.*, 1993; PORTER *et al.*, 1995). Como consequência dessa oxidação, ocorrem transtornos nas funções exercidas pela membrana plasmática, tais como seletividade e transporte, extravasamento do conteúdo de certas organelas como as enzimas nos lisossomos (GUTTERIDGE, 1988).

Divide-se a LPO em três etapas: iniciação, propagação e terminação, como pode ser visto na Figura 6.

Figura 6 – Etapas da Lipoperoxidação (LPO).



Fonte: LIMA & ABDALLA, 2001.

A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o AGPI sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH₂-), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; LIMA, ABDALLA *et al.*, 2001). Passando então, para fase de propagação, a reação do radical peróxido com o átomo de

hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a LPO (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). Íons de metais de transição, como Fe^{n+} e Cu^{n+} , podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos. A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). Portanto, a determinação da LPO é um método eficaz de monitorar o estresse oxidativo e pode servir como um biomarcador sensível da contaminação ambiental por metais em girinos.

3.3 Contaminantes e Contaminação Aquática

A água subterrânea verte por meio de nascentes incrustadas em morros com ampla cobertura florestal, apresentando normalmente padrão de potabilidade (BRASIL, 2004). Contudo, a ação antrópica em áreas rurais (DONADIO *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2007), por meio de ações como: cultivo em áreas inapropriadas ou de preservação (RHEINHEIMER *et al.*, 2003; MINELLA *et al.*, 2007), uso de agrotóxicos (BORTOLUZZI *et al.*, 2006 e 2007; GRÜTZMACHER *et al.*, 2008; FERNANDES NETO & SARCINELLI, 2009), substituição da mata nativa por espécie exótica (BUENO *et al.*, 2005), adubação fosfatada (ANDRADE *et al.*, 2007) e ausência de tratamento de dejetos (SANTOS *et al.*, 2007), altera os parâmetros de potabilidade das águas, conferindo à atividade agrícola um grande potencial poluidor, somado à atividade industrial, como mineração, termoelétricas, curtumes e outras, é possível afirmar que também é responsável pela contaminação das águas e ambientes próximos com seus efluentes descartados.

O fator preocupante que advém dessa superprodução é a constante inserção de compostos químicos acidental ou propositalmente nos compartimentos ambientais, gerando efeitos negativos sobre o equilíbrio natural dos ecossistemas, uma vez que grande parte destes compostos é considerada tóxica para os organismos (MANN *et al.*, 2009). Diversas classes de compostos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais, os chamados “contaminantes emergentes”, agrotóxicos e fertilizantes, dentre outros, atingem o compartimento aquático através de variadas fontes de emissão, como drenagem agrícola, lançamento de esgoto doméstico em rios e mares, efluentes industriais, entre outras, causando danos ao ecossistema (RASHED, 2001).

Os principais contaminantes, segundo Zagrebin *et al.* (2016), dividem-se em inorgânicos (metais e ânions) e orgânicos (hidrocarbonetos, bifenilos policlorados, dibenzodioxinas policlorados, dibenzofuranos policlorados, bifenilos polibrominados, inseticidas organoclorados, inseticidas organofosforados, inseticidas carbamatos, inseticidas piretróides, herbicidas fenoxi, raticidas anticoagulantes, detergentes, clofenóis e compostos organometálicos).

Cada vez mais as atividades agrícolas são reconhecidas como causadoras de impactos e alterações ambientais, sendo os resíduos de agrotóxicos e fertilizantes os principais contaminantes e o uso de praguicidas na agricultura uma das principais causas de contaminação das águas superficiais e subterrâneas (MORON *et al.*, 2006). O risco de contaminação de recursos hídricos por praguicidas aumenta durante o período de chuvas. Os praguicidas utilizados nas plantações são carregados pela água da chuva até rios, lagos permanentes ou temporários, dentre outros, podendo causar efeitos tóxicos à biota de tais ambientes. Em regiões tropicais com sazonalidade bem definida, a ocorrência e a reprodução de grande parte das espécies estão restritas à estação chuvosa, como é o caso de anfíbios anuros (ROSSA-FERES; JIM, 1994).

Os agrotóxicos estão entre os principais contaminantes antropogênicos que alcançam os ecossistemas aquáticos (MENNILLO *et al.*, 2017). Diversos herbicidas e fungicidas utilizados para o controle de pragas infestantes de lavouras apresentam em sua formulação os ingredientes ativos atrazina e tebuconazole, respectivamente (IBAMA, 2010).

Metais estão amplamente distribuídos no ambiente e são componentes naturais da biosfera. Devido à sua natureza persistente e baixa eliminação dos compartimentos ambientais, são um dos maiores e mais abundantes grupos de microcontaminantes e encontram-se no ambiente associados à vários elementos. Embora não possam ser sintetizados ou destruídos, os metais podem ser redistribuídos em escala regional e global (PASCALICCHIO, 2002). Com isso, a resolução 357 do CONAMA estabelece as concentrações dos metais permitidas em efluentes ambientalmente seguros e a tabela 1 mostra a correlação das densidades dos metais, ditos pesados e suas concentrações permitidas.

São amplamente mais conhecidos o destino e os efeitos dos xenobióticos na biota uma vez que a poluição e a contaminação ambiental estão afetando não somente o indivíduo, mas também o metabolismo ecológico das comunidades e dos ecossistemas. Conseqüentemente, a poluição está mudando a tendência evolutiva de toda biosfera (BHADURI *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Concentração dos Metais, classe II

Metais	Densidade (g/cm ³)	Concentração Máxima (mg.L ⁻¹)
Arsênio (As)	5,8	0,5
Cádmio (Cd)	8,7	0,2
Chumbo (Pb)	11,3	0,5
Cobre (Cu)	8,8	1,0
Ferro (Fe)	7,8	15,0
Merúrio (Hg)	13,5	0,01
Níquel (Ni)	8,9	2,0
Zinco (Zn)	7,14	5,0

Fonte: Resolução CONAMA 430/2011 com modificações da autora.

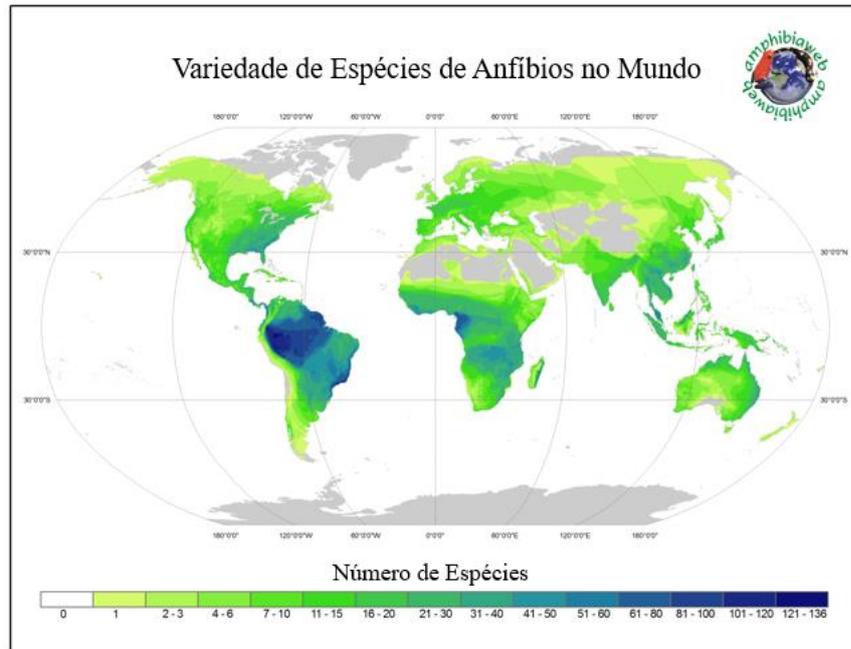
De fato, os compostos químicos ou xenobióticos no ambiente podem provocar um aumento na produção de EROs, com alteração de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em organismos aquáticos. As defesas antioxidantes farão a desintoxicação e/ou eliminação desses produtos presentes nos organismos (AHMAD *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2010).

3.4 Modelo Experimental

3.4.1 Anfíbios

A classe Amphibia compreende animais com tegumento permeável, úmido e sem escamas, sendo distribuídos em três ordens: Urodela (salamandras); Anura, (sapos, rãs e pererecas); Gymnophiona (anfíbios desprovidos de patas) (POUGH, JANIS e JOHN, 2008). Os anfíbios mais diversificados no mundo são os sapos, rãs e pererecas (Ordem Anura). São conhecidas atualmente cerca de 7940 espécies desses animais no mundo, sendo 7008 da ordem Anura e 1137 espécies identificadas no Brasil (SBH, 2019). A Figura 7 mostra a riqueza de espécies em escala global.

Figura 7 – Espécies de anfíbios em escala global

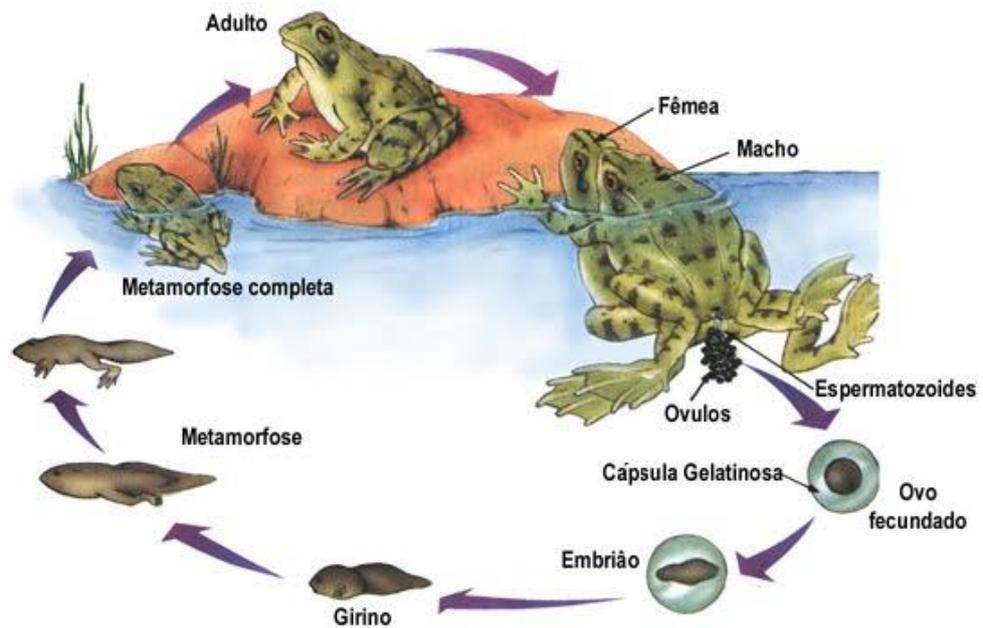


Fonte: Amphibia Web, 2019.

O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de anfíbios anuros por causa do clima e da facilidade de encontrarem ambientes com água (HARTMANN et al, 2010). Os anfíbios são particularmente sensíveis a variações ambientais devido as suas particularidades comportamentais e fisiológicas, tais como: pele permeável, pouca mobilidade, complexo ciclo de vida com dependência de ambientes aquático e terrestre, grande diversidade de modos reprodutivos, diferença na dieta entre girinos e adultos (BLAUSTEIN; WAKE, 1990; VITT *et al.*, 1990; ALFORD; RICHARDS, 1999, CARAMASCHI *et al.*, 2000; BEEBEE; GRIFFITHS, 2005). São extremamente importantes por exercerem papel relevante nos ecossistemas aquáticos, uma vez que, geralmente, passam a fase larval e certos períodos de suas vidas nos ecossistemas aquáticos e terrestres (fase adulta). Segundo Relya (2002) as características que tornam os anfíbios bons indicadores ambientais são pele permeável, ovos sem casca e ciclo de vida com duas fases (Figura 8).

O ciclo se inicia com sua reprodução, onde os óvulos fecundados permanecem na água tornando-se um embrião que, quando eclode, passa a ser chamado de girino. A maioria das espécies de anfíbios depende do ambiente aquático para a reprodução. Embora haja diversas exceções, a forma mais comum de reprodução envolve a deposição de ovos aquáticos, dos quais eclodem larvas aquáticas que, após um período variável de tempo, sofrem metamorfose, originando a fase terrestre (HADDAD, 2005).

Figura 8 – Ciclo de vida do anfíbio



Fonte: Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro - FIPERJ, 2007.

Além disso, os anfíbios são importantes componentes de muitas comunidades ecológicas, seja consumindo uma infinidade de insetos ou servindo de presas para outros animais. Assim, devido às suas características ecológicas e fisiológicas, os efeitos acumulativos de poluentes são facilmente identificados.

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados a conquistar os ambientes terrestres, embora esta conquista não tenha sido definitiva devido à dependência que apresentam em relação aos ambientes aquáticos ou úmidos para a sobrevivência e reprodução (NEWMAN, 1998; RAFFEL *et al.*, 2006; WELLS, 2007; CASSEMIRO *et al.*, 2012). Como parte significativa da respiração é feita através da pele, esta deve ser permeável e estar constantemente úmida. Essas características fazem dos anfíbios animais bastante vulneráveis à dessecação e à contaminação pela pele (DUELLMAN, 1986).

3.4.2 Anuros

Os anfíbios anuros são especialmente susceptíveis à degradação ambiental por causa das várias características básicas, dentre elas destacam-se, a sua fisiologia ectotérmica, com capacidade limitada para a atividade de depuração de xenobióticos, a sua pele vulnerável a diversos agentes biológicos ou químicos e seus ovos e larvas, por serem dependentes da água ou de ambientes úmidos (WELLS, 2007; CIANCIARUSO *et al.*, 2009; PILLAR, DUARTE, 2010; MOUQUET *et al.*, 2012). É característico dos anuros um corpo inflexível e nadar por

meio de golpes simultâneos das patas traseiras. Alguns paleontólogos sugerem que a forma do corpo desses animais evoluiu devido às vantagens desse modo de natação. Uma hipótese sugere que a forma do corpo dos anuros é uma possível vantagem obtida pelo animal para que possa repousar próximo à margem de um fluxo d'água e escapar de predadores aquáticos ou terrestres com um salto rápido seguido de locomoção na terra ou na água (POUGH *et al.*, 2008).

As mais de 5000 espécies de sapos e rãs que compõem a ordem Anura (do grego an = sem + oura = cauda) são, para a maioria das pessoas, os anfíbios mais familiares, sendo das 1137 espécies que o Brasil abriga, 500 delas são endêmicas (FROST, 2019; SBH, 2019). Dentro de cada família há a subdivisão de gênero e espécie, tornando assim uma grande ordem, como pode ser visto na Tabela 2, onde são apresentadas três famílias de anfíbios anuros e o respectivo número de espécies.

Tabela 2 – Família de Anuros

Família	Espécie	Exemplo da espécie
Ranidae	343	Rã-touro
Bufonidae	555	Sapo comum
Hylidae	829	Perereca europeia

Fonte: International Union for Conservation of Nature, 2019

Atualmente, os anuros são reconhecidos como um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo e vêm sofrendo um declínio de grandes proporções desde a década de 1980. Cerca de 40% das espécies de anuros correm risco de desaparecer nos próximos anos (IUCN, 2019).

Segundo Giasson e Haddad (2007) fêmeas de determinadas espécies de anuros não são tão seletivas na escolha dos parceiros. Os autores atribuíram este comportamento como uma tática para garantir o sucesso reprodutivo, já que grande parte das espécies está em extinção. Durante a primeira fase de vida, anfíbios anuros são aquáticos e possuem respiração branquial e cutânea. Vários estudos, nas formas de observação e teste de substâncias, (DAVID *et al.*, 2012; LAVORATO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MACAGNAN *et al.*, 2017) atribuem o declínio na fauna de anfíbios principalmente à perda e modificação de hábitat. As atividades agrícolas consomem grandes áreas, além de utilizarem grande variedade de praguicidas e fertilizantes. Tais condições isoladamente ou em combinação com outros estressores têm recebido maior atenção por serem responsáveis pelo declínio da população de anfíbios anuros (MANN *et al.*, 2009). Por esse motivo, tem sido usual a inclusão desses anuros em programas de monitoramento ambiental (GIBBONS *et al.*, 2002).

3.4.3 *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)

Lithobates catesbeianus é um ranídeo naturalmente distribuído no leste da América do Norte, pelos entremeios da Nova Escócia e o Estado da Flórida (FROST, 2008). Possui porte avantajado e crescimento corpóreo no decorrer de quase todo período de vida. Quando adulta, pode apresentar medida rostro-cloacal de cerca de 150 mm (HOWARD, 1981). Na Figura 9 é apresentada um exemplar de fêmea de rã-touro.

Figura 9 – Fêmea de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*.



Fonte: Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo, IB-USP, 2017.

Em seu ambiente natural, *L. catesbeianus* atua como um competidor e predador, o que lhe confere um importante papel ecológico de modo a regular a abundância e ocorrência de outros organismos (HECNAR, 1997). Os anfíbios são conhecidos por se alimentarem de quase tudo que possam capturar e engolir e a rã-touro possui esta característica bem acentuada (POUGH, 1996).

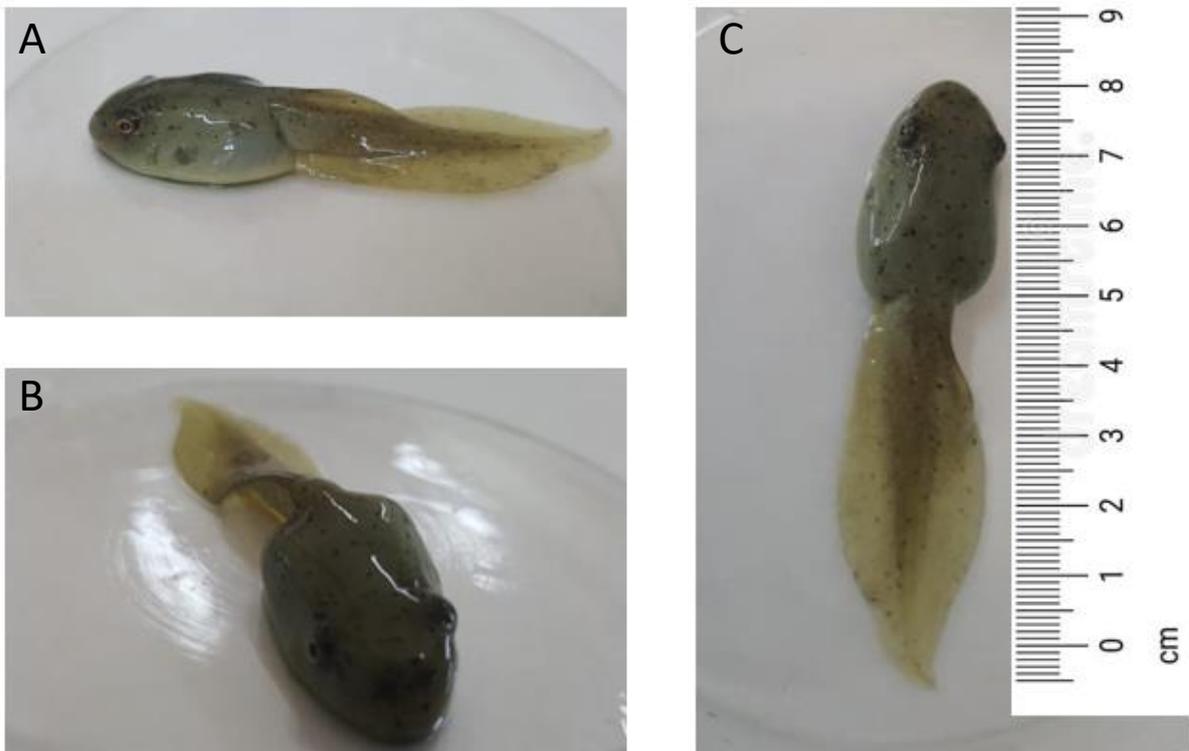
Os girinos dessa espécie são de cor verde oliva, com manchas escuras sobre o dorso; na região ventral, apresentam coloração esbranquiçada ou creme clara (Figuras 10 e 11). Nessa fase aquática podem atingir até 17 cm de comprimento (VIEIRA, 1993, p. 18). Enquanto girinos, esses animais apresentam a cabeça e o corpo compostos por uma única estrutura, uma cauda muscular sem vértebras, além de nadadeiras ventrais e dorsais desprovidas de suporte ósseo (MCDIARMID; ALTIG, 1999). O intestino é organizado em espiral, o fígado é bem evidente entre as vísceras e o aparato oral queratinizado é adaptado para a ingestão de uma ampla variedade de alimentos (Figura 10) (MCDIARMID; ALTIG, 1999). A dieta na fase larval varia muito, tendo um hábito alimentar generalista (HADDAD, 2008).

Figura 10 – Organização interna do girino de *L. catesbeianus* (1), Focinho (2), brânquia (3), coração (4), fígado (5), intestino (6), cauda (7).



Fonte: VIDAL, 2019

Figura 11 – Girino de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, A - Girino visto lateralmente; B – Focinho e olhos do girino; C – Medida do girino



Fonte: Autora

Atualmente a espécie encontra-se distribuída pelo território brasileiro, tanto em produções comerciais como na natureza. Em relação ao ponto de vista experimental, *L. catesbeianus* é de fácil manutenção em cativeiro e para a experimentação animal (FRANÇA-SALGUEIRO, 2013).

As condições climáticas tropicais e subtropicais do Brasil possivelmente favorecem o desenvolvimento e reprodução desses animais, que comprovadamente possuem um desempenho metabólico melhorado de acordo com o aumento da temperatura do ambiente (BRAGA, 2001).

3.5 Caracterização do ambiente

Embora três quartos da superfície da Terra seja composta de água, a maior parte não está disponível para consumo humano, pois 97% são água salgada, encontrada nos oceanos e mares e 2% formam geleiras inacessíveis. Apenas 1% de toda a água é doce e pode ser utilizada para consumo do ser humano e outros animais. Deste total, 97% estão armazenadas em fontes subterrâneas. Por essa razão, o uso racional e a manutenção da qualidade da água existente tornam-se essenciais (MANSON, 1996).

O Brasil dispõe de uma considerável riqueza de recursos hídricos, detendo quase 15% das reservas hídricas de todo o Planeta. Entretanto, o uso irracional da água já representa um motivo de urgência em muitos distritos brasileiros, pois grande parte dos rios e mananciais encontra-se poluída, incluindo aqueles utilizados para abastecimento público. Isso pode representar um sério problema à população pois, de modo geral no país, as áreas mais densamente urbanizadas são as que apresentam menor potencial hídrico e maior grau de contaminação (ATLAS BRASIL, 2010).

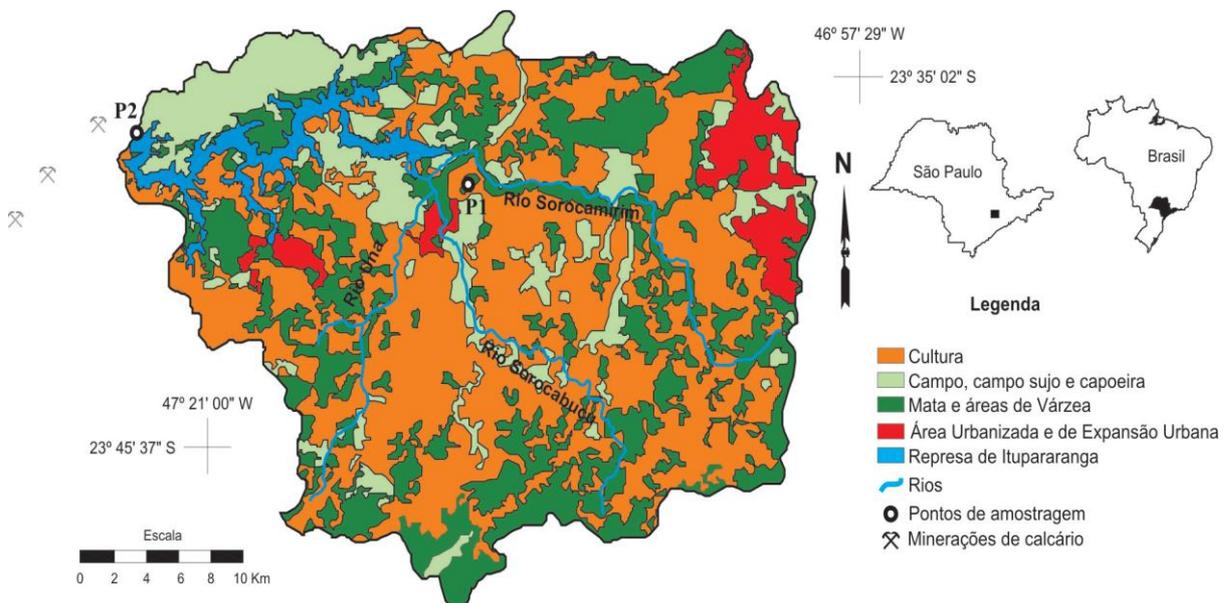
A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005, em seu artigo 3º, classifica as águas segundo sua qualidade e seu uso em 13 categorias, separadas por doce (classe especial, classe 1, classe 2, classe 3, classe 4), salina (classe especial, classe 1, classe 2, classe 3) e salobra (classe especial, classe 1, classe 2 e classe 3) (BRASIL, 2005) e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida. Entretanto, águas classificadas como de uso doméstico (classe 2) podem conter compostos químicos em concentrações acima do permitido pela resolução devido à utilização humana, visto que diversas atividades domésticas utilizam produtos químicos e fármacos (PEDRASSI, 2009, CONCEIÇÃO *et al.*, 2011).

3.5.1 Bacia Alto Sorocaba

Como uma das seis sub-bacias, a bacia do Alto Sorocaba compõe a bacia do Sorocaba Médio Tietê (SMT), possui área de 929 km² e está situada a sudeste do Estado de São Paulo. Dentro dessa Bacia, é possível afirmar que seu principal curso d'água é o Rio Sorocaba, que nasce em Ibiúna e é formado pelos rios de Una, Sorocabuçu e Sorocamirim (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011) (Figura 12). Composta por nove cidades, tem uma população de 625.626 habitantes composta pelos municípios da região. Uma barragem do reservatório de Itupararanga é responsável por represar as águas dessa bacia, sendo o mesmo um importante manancial da região (PEDRAZZI, 2009).

Os corpos d'água dessa Bacia se enquadram na Classe 2 da resolução 357 de 2005 do CONAMA; sendo assim, podem ser utilizadas para: a) o abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) a proteção das comunidades aquáticas; c) a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; d) a irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e, e) a aquicultura e a atividade de pesca (Brasil, 2005).

Figura 12 - Mapa de localização da bacia do Alto Sorocaba



Fonte: CONCEIÇÃO *et al.*, 2011

O rio Una, identificado no mapa como ponto 1 (P1) (S 23°27'27,0" W 47°24'10,1"), fica próximo à cidade de Ibiúna, a qual é a principal agente poluidora da área devido ao crescimento urbano sem planejamento e pelo descarte de seus efluentes domésticos e industriais no rio (SALLES *et al.*, 2008, SARDINHA *et al.*, 2008, PEDRAZZI *et al.*, 2014). No

reservatório de Itupararanga, identificado no mapa como ponto 2 (P2) (S 23^o38'11,3'' W 47^o13'22,6''), o uso da terra é vinculado à agricultura como hortifrutigranjeiras, além da presença de chácaras e residências ao sul do reservatório. Segundo Conceição *et al.* (2015), nos afluentes da represa há despejo de esgoto doméstico e não existe sistema de coleta e transporte de lixo no local.

Partindo dos meios de contaminação mais comuns, é possível identificar no município de Ibiúna que tem parte de seu esgoto tratado, porém o município possui cerca de 50 bairros rurais, que não possuem tratamento de esgotos onde Sardinha (2007) documentou a má qualidade das águas dos rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una, principais formadores do reservatório, influenciando sua qualidade da água.

A bacia do Alto Sorocaba apresenta clima *Cwa*, segundo a classificação de Köppen-Geiger, ou seja, apresentando clima temperado úmido, com inverno seco e verão quente. A temperatura média anual é de 20 °C e no semestre seco a evaporação é maior que a precipitação (CBA, 2006).

A bacia abriga a Reserva da Biosfera do Cinturão Verde de São Paulo, além de uma Área Natural Tombada em Caucaia do Alto e a área de Proteção Ambiental de Itupararanga. Já sua vegetação natural é composta por uma floresta ombrófila densa e cerrada, sendo de domínio da Mata Atlântica, que sobreviveu à urbanização e permaneceu remanescente nesta área (IPT, 2005).

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostras de água e sedimento do rio Sorocaba

As amostras de água superficial e também de sedimento de leito foram coletadas, nos meses de março/2019 e agosto/2019, em dois pontos do rio Sorocaba. No campo foram medidos os parâmetros físico e químicos da água – pH e temperatura.

As amostras de águas superficiais em cada ponto foram coletadas manualmente no rio e acondicionadas em galões de 50L totalizando 120L. Amostras de sedimento de leito foram realizadas sob a lâmina d'água utilizando-se uma pá. As amostras de sedimento foram retiradas das áreas de curva convexas do rio, onde os sedimentos tendem a se depositar. A quantidade de amostras de sedimento de leito foi de aproximadamente 500 g. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos etiquetados e mantidas em caixas térmicas sob resfriamento com gelo até a chegada em laboratório onde foram armazenadas em freezer à -20°C até o momento da análise de acordo com a orientação da empresa Laboratório Ambiental - Plantec Laboratórios.

As amostras de água e sedimento foram transportadas para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABioM) e as amostras de água foram utilizadas para exposição dos animais como descrito no item 4.3.

4.2 Coleta e manutenção dos animais em Laboratório

O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos e aprovado sob o no. 2578040219 (anexo 1).

Girinos recém-eclodidos de rãs-touro, *L. catesbeianus*, foram obtidos do ranário Santa Rosa, localizado no município de Santa Bárbara d'Oeste-SP (22°46'53,0"S/47°24'17,7"W). Os animais foram acondicionados em sacos plásticos com capacidade de 80 L e imediatamente transportados para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABioM) do *Campus* de Sorocaba da UFSCar.

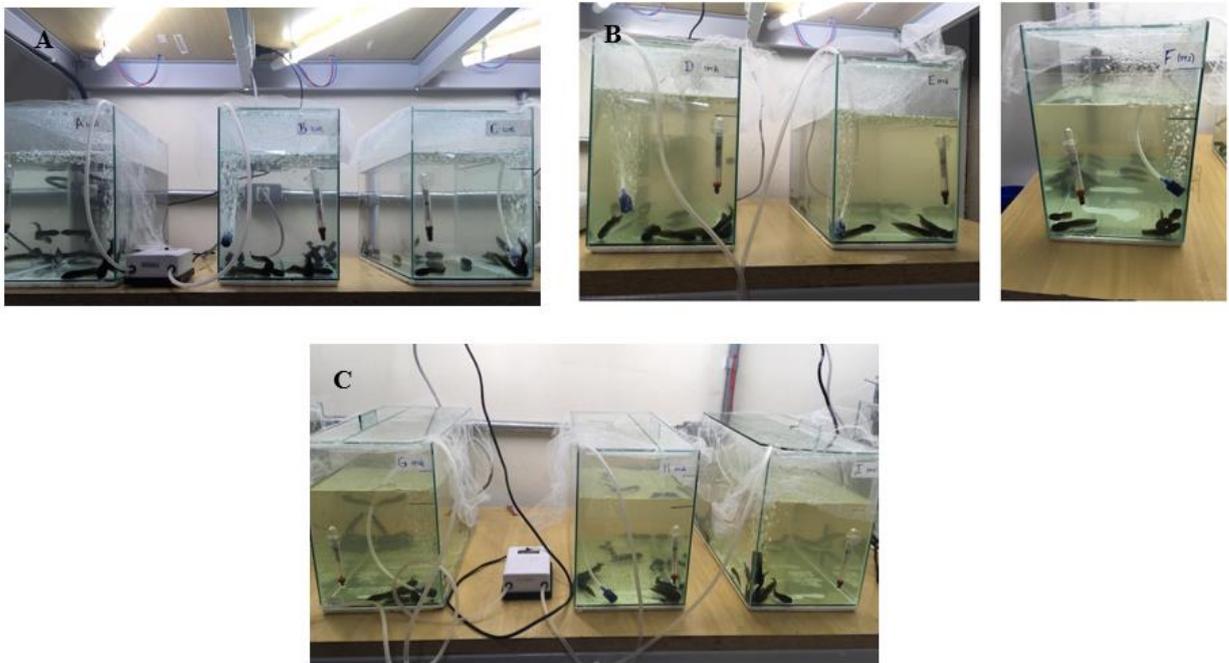
Os girinos foram mantidos, cerca de 15 dias, em aquários com capacidade de 50 L para aclimação, com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), aeração constante ($> 6.0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), fotoperíodo natural (12h luz;12h escuro) e protegidos de distúrbios externos. Os girinos foram alimentados diariamente com ração comercial farelada (Alcon Garden Basic Sticks®), contendo 25% de proteína bruta. A alimentação foi cessada 48h antes da exposição para evitar a absorção dos compostos químicos presentes na água com a alimentação. Por fim, os girinos foram submetidos aos bioensaios ecotoxicológicos.

Os testes de exposição com as amostras de água (chuvoso e seco) foram realizados em aquários com capacidade de 12L, distribuídos em 3 réplicas por ponto contendo 12 animais por

aquário (total = 216). Os aquários foram identificados como: 1. CONTROLE onde a água era dechlorada e isenta de contaminantes; 2. PONTO 1, referente à água coletada próximo a cidade de Ibiúna; 3. PONTO 2, referente à água coletada da barragem do reservatório de Itupararanga, como mostrado na figura 13.

As condições de exposição foram as mesmas oferecidas durante a aclimação, todos os procedimentos foram seguidos de acordo com os padrões estabelecidos pelo protocolo da American Society for Testing and Materials (ASTM, 2014). Os experimentos (controle e expostos) foram desenvolvidos em sistema estático durante 96h.

Figura 13 – A. Aquários grupo controle; B. Aquários contendo água do Rio Sorocaba do ponto 1; C. Aquários contendo água do Rio Sorocaba do ponto 2



Fonte: Autora.

O comportamento dos girinos, bem como a temperatura e pH dos aquários, foram observados regularmente durante todo o período de exposição. Finalizado o período de exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,01% e em seguida foram descerebrados para coleta do fígado e imediatamente congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realização das análises bioquímicas como descrito no item 4.5.

4.3 Análises da água e do sedimento

Os parâmetros físico e químicos como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e os compostos químicos propostos neste estudo foram determinados na água e no sedimento, antes e no final da exposição. Os valores medidos foram comparados com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/05 para classificação de uso da água do tipo 2.

Após o período de exposição, amostras de água foram acondicionadas de acordo com a orientação da empresa e transportadas para o Laboratório Ambiental - Plantec Laboratórios. As análises das amostras foram feitas em triplicata. Os metais foram determinados por espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) com limite de quantificação (LQ) para a água de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ para o alumínio (Al) e $1\mu\text{g.L}^{-1}$ para o Cd, Cu, manganês (Mn) e Zn e para o sedimento o LQ foi de $2500\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o Al e $250\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o Cd, Cu, Mn e Zn. O diclofenaco foi determinado por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (LQ $2\mu\text{g.L}^{-1}$) e o paracetamol pela Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas (LQ $5\mu\text{g.L}^{-1}$ para a água e $0,25\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o sedimento). O glifosato foi determinado pelo método de PLAM 041 (LQ $50\mu\text{g.L}^{-1}$ para a água e $30\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o sedimento) e os pesticidas pelo método de PLAM 140, Extração Líquida-líquida de função separatória (EPA - US-Environmental Protection Agency, 3510C, 1996) (LQ $0,005\mu\text{g.L}^{-1}$ para a água e $1,5\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o sedimento).

4.4 Análises bioquímicas

4.4.1 Obtenção do homogenizado

A homogeneização do fígado foi realizada individualmente com tampão Fosfato Salina (tampão PBS, contendo 1,36 M de NaCl, 0,027 M de KCl, 0,054 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ e 0,018M de 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 0,7 g de amostra de tecido. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 12000g por 20 minutos, e após o sobrenadante foi separado em alíquotas (em tubos ou placas) para as diferentes análises bioquímicas. As amostras foram congeladas a -82°C .

Durante a realização das determinações bioquímicas, as amostras foram mantidas em gelo e/ou preparadas sobre superfície gelada para minimizar a degradação do material analisado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.4.2 Quantificação de Proteínas

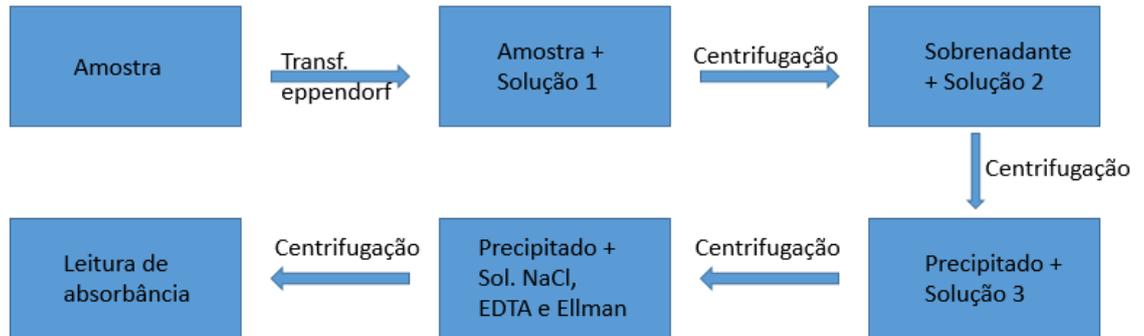
A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A albumina sérica bovina foi utilizada como padrão proteico e a concentração de proteína foi expressa como mg de proteína por mL⁻¹. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram aplicadas nas microplacas e em seguida foram adicionados a cada poço 250 µL de reativo Bradford, o qual continha 100 mg de Cromacie Blue dissolvido em 50 mL de álcool 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e completado para 1 L com água destilada. Para o branco, 10 µL do tampão PBS foi adicionado em 250 µL de reativo de Bradford. A concentração de proteínas foi calculada a partir da equação obtida na curva padrão utilizando-se albumina bovina e expressa como mg de proteína por mL.

4.4.3 Quantificação de Metalotioneína (MT)

A concentração de MT foi determinada de acordo com o método descrito por Viarengo (1997). A glutatona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão de conteúdo de -SH (grupos sulfidrilas) de acordo com a equação obtida pela curva determinada a 412 nm. Alíquotas de 200 µL do homogeneizado foram transferidos para os tubos *eppendorf* 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, 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 e de solução EDTA-sódico (1:1). A figura 14 mostra o esquema simplificado da metodologia utilizada.

Para o cálculo da concentração da MT foram determinadas as médias das absorbâncias, excluído 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 SH por mg de proteína.

Figura 14 – Esquema da análise de MT



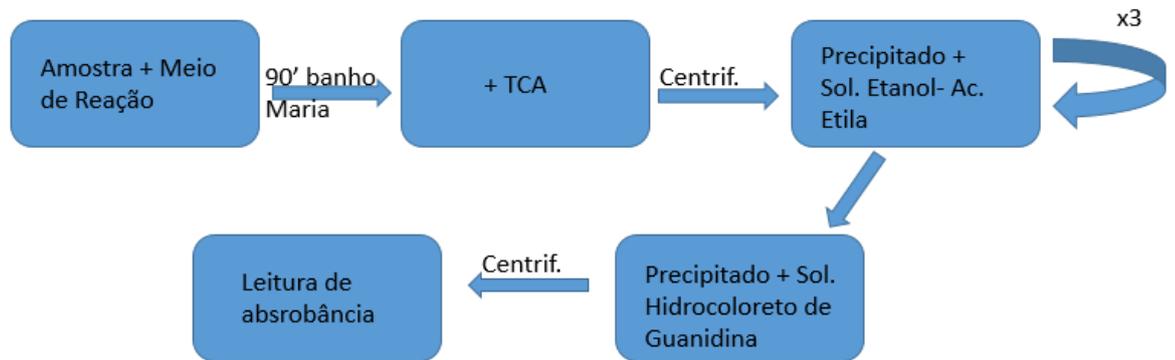
Fonte: Autora

4.4.4 Quantificação de Proteínas Carboniladas (PCO)

A concentração de PCO 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 (DNFH) 10 mM em 28 mL de HCl 2 M. Para o branco foram utilizados 200 μL de PBS 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 PCO, foi realizada a média das absorbâncias e excluído o branco. A concentração de PCO foi expressa em nmoles de carbonilas por mg de proteína por mL utilizando-se o coeficiente de extinção de 22.000 do DNFH. A figura 15 apresenta o esquema da metodologia utilizada.

Figura 15 – Esquema para Análise da PCO



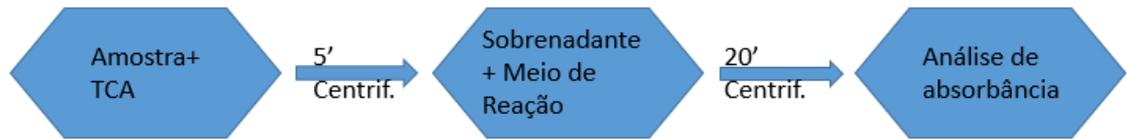
Fonte: Autora

4.4.5 Quantificação de LPO

A concentração de LPO foi determinada de acordo com o método de oxidação do ferro por alaranjado de xilenol (FOX) descrito por Jiang (1991). As alíquotas de 200 μL 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 μL do meio de reação contendo 47,37 μL de metanol P.A., 1 mL da solução de laranja de xilenol dissódico 100 μM (dissolvido em 1 mL de metanol), 125 μL de H_2SO_4 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 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, excluindo 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. A figura 16 mostra as etapas seguidas a metodologia utilizada.

Figura 16 – Esquema para análise de LPO



Fonte: Autora

4.5 Procedimento estatístico

Os resultados foram expressos na forma de média \pm EP (erro padrão). Os valores médios obtidos de cada parâmetro para cada tratamento (controle, P1 e P2), foram comparados entre si e para cada período de exposição (seco e chuvoso) usando o teste t ou Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância). As concentrações dos compostos químicos na água e no sedimento também foram comparadas entre os tratamentos e os períodos de exposição usando a análise de variância fator único (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade das variâncias). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

5 Resultados e Discussão

5.1 Água e Sedimento

As amostras de água e do sedimento dos pontos 1 e 2, de ambos os períodos, foram avaliadas para verificar a presença e concentração dos compostos químicos de interesse neste estudo. Os resultados da análise da água estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

A temperatura da água não apresentou alteração significativa durante o período de exposição nos dois pontos em relação ao controle. Entretanto, a temperatura da água foi maior no período chuvoso (22-26 °C) do que no período seco (13-18 °C), similar ao verificado por Pedrazzi et al. (2014) no Reservatório de Itupararanga, Bacia do Alto Sorocaba (SP). As variações de temperatura são parte do regime climático normal e corpos de água naturais apresentam variações sazonais e diurnas, bem como estratificação vertical. A temperatura superficial também é influenciada por fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade. A elevação da temperatura em um corpo d'água geralmente é provocada por despejos industriais (indústrias canavieiras, por exemplo) e usinas termoelétricas (CETESB, 2009). A temperatura é essencial nos processos químicos, físicos e biológicos e influencia a atividade biológica e o crescimento de organismos aquáticos.

Segundo Silva e Araújo (2017), a temperatura da água apresenta sazonalidade, variando de acordo com a estação do ano, sendo as temperaturas maiores no período chuvoso, de acordo com o encontrado neste estudo. Também Lemos *et al.* (2010) e Oliver e Ribeiro (2014) que analisaram a influência climática na temperatura dos corpos d'água, corroborando que a temperatura é influenciada por fatores como, altitude, latitude, período do dia e estação do ano.

Em relação ao pH, não houve alteração no início e no final da exposição, entretanto a água referente ao período seco apresentou pH mais elevado (pH 8,0) em relação ao chuvoso (pH 6,7), onde é possível notar que a temperatura elevada tem pH mais baixo, e o inverso também se mostra verdadeiro. O pH é mantido pelo equilíbrio do dióxido de carbonato-bicarbonato e carbonatos, podendo alterar o processo de permeabilidade da membrana celular. De acordo com Von Sperling (1996), a variação do pH pode ter origem natural (dissolução de rochas, absorção de gases, oxidação de matéria orgânica e fotossíntese) e/ou origem antropogênica (despejos domésticos e despejos industriais) e uma pequena diminuição no pH pode estar associada ao aumento no teor de matéria orgânica disponível no corpo d'água, como descrito por Maier (1987). Os valores obtidos nos dois pontos indicam que as águas da bacia são praticamente neutras, dentro da faixa de proteção da vida aquática, preconizadas pela Resolução CONAMA no. 357/05 (Brasil, 2005).

Não foi detectada a presença de fármacos ou pesticidas na água nos dois pontos e nos dois períodos; portanto, estes compostos foram omitidos das tabelas.

No que se refere à não detecção dos fármacos e pesticidas na água e no sedimento do rio Sorocaba, parte pode ser atribuída ao período chuvoso, corroborado pelo estudo de Fernandes *et al.* (2009) em um estudo sobre agrotóxicos em água para o consumo humano demonstraram que a vazão pluviométrica é inversamente proporcional às concentrações de xenobióticos analisadas no sedimento. Além disso, os fármacos são encontrados no ambiente na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} e, provavelmente por isso não foram detectados nas amostras de água e sedimento dos pontos 1 e 2. Também estes resultados podem estar relacionados com a vazão do rio e a época de coleta de água (FERNANDES *et al.*, 2009). Nesse sentido, a não detecção desses compostos na água pode ser explicada pela baixa concentração destes compostos e também porque eles passam por transformações no ambiente e no organismo estudado. Outra hipótese para não detecção destes compostos seria sua biotransformação, tendo seu resultado final diferente do inicial no ambiente.

Nas amostras de água verificou-se a presença de metais-traços essenciais e não essenciais como Al, Cu, Mn e Zn (Tabelas 3 e 4). Os metais detectados na água apresentaram concentração abaixo dos limites estabelecidos como seguros pela resolução CONAMA 357/05.

No período chuvoso (Tabela 3), o Al foi detectado em P1 e P2 no início da exposição, com $29,10 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $27,50 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, porém não foi detectado em P1 no final da exposição, enquanto que em P2 a concentração de Al aumentou significativamente no final da exposição comparado com o controle, tendo uma concentração de $116,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Esse resultado indica que o Al foi absorvido pelos animais que foram expostos na água do P2.

Em relação ao período seco (Tabela 4), o Al foi detectado em todos os grupos, exceto no início da exposição no grupo controle e no final da exposição em P2. A presença de Al no grupo controle no final da exposição demonstra que os animais eliminaram este metal na água e a ausência dele no grupo P2 indica que o metal foi absorvido pelos girinos. Enquanto que em P1 a concentração de Al foi de $111,79 \mu\text{g.L}^{-1}$ antes da exposição e diminuiu significativamente para $20,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ no final da exposição. Este resultado reforça que o metal foi absorvido pelos girinos. O Al pode ter efeitos prejudiciais no ambiente aquático, bem como em seres humanos que podem consumir peixes contendo altos níveis deste metal (CASARINI *et al.*, 2001, CAMARGO *et al.*, 2009). A forma inorgânica de Al tem sido relatada como a mais prejudicial para várias espécies de peixes (CAMARGO *et al.*, 2009).

O Cu foi detectado em todos os grupos no início e no final da exposição no período chuvoso, exceto no P1 ao final da exposição e este resultado indica que o Cu foi absorvido pelos

girinos neste grupo. Entretanto, houve aumento significativo do Cu no grupo controle ($2,2 \mu\text{g.L}^{-1}$) e em P2 ($1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$) no final da exposição (tabela 3), indicando que houve uma liberação de Cu por parte dos girinos. No período seco o Cu foi detectado no início e no final da exposição no grupo controle e não houve diferença significativa entre as concentrações. Já em P1 e P2, este metal não foi detectado no início da exposição, mas no final da exposição as concentrações foram de $2,45 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $2,26 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (tabela 4). As fontes de Cu no ambiente incluem corrosão de tubulações de latão por águas ácidas, escoamento superficial, efluentes de estações de tratamento de esgotos, uso de compostos de cobre como algicidas aquáticos, uso agrícola em fungicida e pesticida no tratamento de solos e efluentes e precipitação atmosférica de fontes industriais (como indústrias de mineração, fundição e refinação) (CETESB, 2006). O Cu também está presente nos agrotóxicos utilizados nas atividades agrícolas e, por isso, é considerado um poluente do solo e da água e pode ser absorvido e armazenado no organismo de animais e de plantas (CETESB, 2006; BENITES *et al.*, 2014).

O Mn foi detectado em todos os grupos, exceto no controle no início da exposição no período chuvoso. Em comparação com o controle, os pontos 1 e 2 apresentaram maior concentração desse metal no início da exposição, com $31,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $32,4 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (tabela 3). No período seco o Mn foi detectado em todos os grupos, exceto no controle no início da exposição. Em P1 e P2, as concentrações no início da exposição foram de $93,64 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $86,78 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente e foram maiores que no final do experimento (P1 = $18,27 \mu\text{g.L}^{-1}$ e P2 = $28,47 \mu\text{g.L}^{-1}$) (tabela 4), mostrando diferença significativa entre eles e indicando também que os girinos expostos nessas águas absorveram este metal.

O Mn é um oligoelemento natural encontrado em muitos tipos de rochas e solo, no entanto, não ocorre no ambiente como um metal puro. Em vez disso, ocorre combinado com outras substâncias, como oxigênio, enxofre e cloro. O Mn é essencial para o desenvolvimento normal e desempenha funções importantes ao longo da vida dos mamíferos (CROSSGROVE e ZHENG, 2004, O'NEALL e ZHENG, 2015). O Mn regula a atividade de muitas enzimas, por exemplo, ele é um co-fator necessário para a arginase, responsável pela produção de uréia no fígado, a superóxido dismutase (SOD), essencial para prevenir o estresse oxidativo celular, e a piruvato carboxilase (PEPCK), enzima essencial na gliconeogênese (CARL e GALLAGHER, 1994, KLEEN *et al.*, 2000, CROSSGROVE e ZHENG 2004). Entretanto, em concentrações altas pode se tornar tóxico para os organismos devido a superexposição ao metal que pode levar a danos neurodegenerativos progressivos e permanentes (CROSSGROVE e ZHENG 2004, O'NEALL e ZHENG, 2015).

O Zn esteve presente em todos os grupos analisados, mas em comparação com o controle ($79,6 \mu\text{g.L}^{-1}$), as concentrações foram menores em P1 e P2 com $6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $5,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, antes da exposição no período chuvoso. No final da exposição houve aumento da concentração do Zn de $38,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ em P1 e $32,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ em P2. Entretanto a concentração do Zn, nos dois pontos, foi significativamente menor que a detectada no controle no início e no final da exposição (tabela 3). Já no período seco o Zn não foi detectado no início da exposição em P1 e P2, tendo suas concentrações finais de $11,56 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $4,20 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A concentração do Zn foi maior nos grupos controle e aumentou significativamente no controle ao final da exposição. Em P2 a concentração do Zn foi menor em comparação com o controle e P1 no final da exposição (tabela 4). O Zn é amplamente utilizado na indústria e pode entrar no ambiente devido aos processos naturais e antropogênicos, entre os quais destacam-se a produção de zinco primário, combustão de madeira, incineração de resíduos, produção de ferro e aço, efluentes domésticos (CETESB, 2006).

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos e valores médios dos contaminantes químicos analisados no período chuvoso (março) nas amostras de água superficial (P1 e P2). *indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo período; # indica diferença significativa em relação aos P1 e P2. LQ = limite de quantificação; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição;

Águas Variáveis (março)	CONAMA Águas classe I e II	Controle		Ponto 1		Ponto 2	
		Inicial	Final (96h)	Inicial	Final (96h)	Inicial	Final (96h)
Temperatura (°C)	-	25,0±1,0	23,6±1,4	26,5±2,3	24,1±1,5	24,4±1,0	22,7±1,5
pH	6,0 - 9,0	6,8	6,6	7,7	6,7	6,7	6,7
Alumínio (µg/L)	100	<LQ	<LQ	29,10±1,15	<LQ	27,50±0,98	116,5±7,1↑#
Cádmio (µg/L)	1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobre (µg/L)	9	1,3±0,03	2,2±0,15↑	1,5±0,05	<LQ	1,0±0,10	1,6±0,09#↑
Manganês (µg/L)	100	<LQ	25,1±1,45↑	31,3±2,01*	28,2±1,52	32,4±2,62*	28,2±1,89
Zinco (µg/L)	180	79,6±3,35	71,8±2,34	6,5±0,45*	38,3±2,81↑	5,2±0,89*	32,6±1,9*↑

Fonte: Autora.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e valores médios dos contaminantes químicos analisados no período seco (agosto) nas amostras de água superficial (P1 e P2). *indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo período; # indica diferença significativa em relação aos P1 e P2. LQ = limite de quantificação; ↑↓ indica diferença significativa em relação ao tempo inicial e final de exposição;

Águas Variáveis (agosto)	CONAMA Águas classe I e II	Controle		Ponto 1		Ponto 2	
		Inicial	Final (96h)	Inicial	Final (96h)	Inicial	Final (96h)
Temperatura (°C)	-	24,0±1,0	23,3±1,0	13,7±1,0	23,7±0,6	16,5±1,5	21,0±1,5
pH	6,0 - 9,0	6,7	6,8	7,3	6,9	8,0	6,9
Alumínio (µg/L)	100	<LQ	3,42±5,92↑	111,79±0,59*	20,47±3,93*↓	54,32±0,59*#↓	<LQ
Cádmio (µg/L)	1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobre (µg/L)	9	4,97±0,90	4,72±1,0	<LQ	2,45±0,66*↑	<LQ	2,27±0,23*↑
Manganês (µg/L)	100	<LQ	27,72±7,67↑	93,64±9,75*	18,27±8,37↓	86,78±6,65*	28,47±1,41
Zinco (µg/L)	180	15,97±1,29	23,85±2,83↑	<LQ	11,56±0,59#↓	<LQ	4,20±0,26*#↓

Fonte: Autora.

Comparando-se os resultados obtidos nos dois períodos, as concentrações dos metais Al, Cu e Mn foram mais altas no período seco em relação ao chuvoso, com exceção do Zn que teve concentração mais baixa no período seco. Contrariamente ao observado neste trabalho destacam-se os estudos de Chiba *et al.* (2011) e Souza *et al.* (2016). Chiba *et al.* (2011) que verificaram a sazonalidade de oligoelementos em uma sub-bacia de São Carlos-SP, Sudeste do Brasil, e observaram aumento do Zn, Cd, Ferro (Fe) e Mn. Os autores atribuíram este aumento à maior precipitação de chuva durante os períodos de coleta, resultando no acúmulo dos metais e também devido a presença de indústrias na região e próximas ao local da coleta. Souza *et al.* (2016), que determinaram a concentração de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Níquel (Ni), Pb e Zn nas águas do submédio do Rio São Francisco, observaram concentrações elevadas de Cd, Cr, Ni e Cu acima da permitida pelo CONAMA e nos períodos de maior pluviosidade.

Outros estudos relatam a presença de metais no ambiente aquático como os de Espíndola *et al.* (2005), que verificaram a presença de Cd, chumbo (Pb), Cu, Cromo (Cr), Fe, Magnésio (Mg), Mn e Zn na água do reservatório de Salto Grande (S.P.) em concentrações acima do estabelecido pela resolução CONAMA, enquanto Rocha; Azevedo (2017) verificaram a presença de metais como As, Cd, Cu, Pb, Hg e Zn na bacia do córrego São Mateus (M.G.) em concentrações acima do permitido pela resolução CONAMA, sendo atribuídas a despejo de materiais tóxicos por indústrias e lixo doméstico. No rio Sorocaba destacam-se os estudos de Pedrazzi *et al.* (2014), que verificaram neste rio a presença dos metais Al, Mn, Ni, Pb e Zn em concentrações abaixo dos valores máximos permitidos para águas de Classe 2 pela Resolução 357 do CONAMA (2005) no período chuvoso e o de Conceição *et al.* (2015), que verificaram que as concentrações destes metais estavam acima dos valores estabelecidos pela legislação tanto no período seco quanto no chuvoso. Entretanto, mesmo em baixas concentrações, a toxicidade combinada de vários componentes de uma amostra pode induzir toxicidade nos organismos aquáticos como um efeito aditivo (BRODERIUS, 1990, CARVALHO *et al.*, 2017).

As diferenças entre as concentrações de metal na água no início e no final da exposição indicam que os girinos acumularam metais de alguma outra fonte também ou que foram expostos intermitentemente aos metais anteriormente. É importante ressaltar que a água do P2, no momento da coleta e exposição, continha grande quantidade de matéria orgânica que poderia conter metais e que não foi detectada na água no início da exposição, o que pode explicar em parte o aumento de metais no final da exposição similarmente ao observado por Stolyar *et al.* (2008), que compararam a biodisponibilidade de metais em rãs, *Pelophylax ridibundus* (syn. *Rana ridibunda*), de locais urbanos e rurais do oeste da Ucrânia. Estes autores verificaram que os animais, de ambos os locais, acumularam altas concentrações de metais, apesar das

concentrações dos metais na água estarem abaixo do limite de detecção. Os anfíbios podem absorver os metais pela pele diretamente da água e também pelo sistema digestório a partir dos alimentos ingeridos e acidentalmente do solo e dos sedimentos (PAPADIMITRIOU, LOUMBOURDIS, 2002).

Portanto, embora a concentração dos metais estivesse abaixo do limite permitido pela resolução CONAMA, a presença deles no ambiente pode impactar negativamente os animais que ali vivem, como verificado por Abdel-Moneim *et al.* (2012), que determinaram a presença de metais como chumbo Pb, Cd, Hg, Cu e Cr em vários locais do rio em Al-Hassa, Arábia Saudita e também acúmulo destes metais no fígado, rim e brânquias de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Os autores verificaram também anormalidades nas brânquias e fígados desses animais. Benites *et al.* (2014), analisando as consequências da contaminação por Cu no rio Uruguai (R.S.) utilizaram concentrações deste metal similares às encontradas neste rio (0,08 mg.L⁻¹) e verificaram no zebrafish, *Danio rerio* mutagenicidade (micronúcleo) após 120h de exposição.

As maiores concentrações de metais no rio Sorocaba no período chuvoso em relação ao período seco indicam que os dois pontos escolhidos apresentam diferença sazonal e que o uso do solo influencia na qualidade da água e estas diferenças podem afetar a comunidade aquática e a saúde humana. A presença dos metais nestes ambientes pode levar a um processo de bioacumulação resultante de taxas de assimilação e eliminação e os metais se acumulam a partir da exposição ao sedimento/água e pela cadeia trófica a partir da alimentação (assimilação). Dessa forma, os metais podem ficar distribuídos em diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos, água, sedimento e organismos. Uma vez dentro do animal, o metal pode interferir na fisiologia normal do organismo causando prejuízos.

Portanto, as variações nas concentrações dos metais podem também ser atribuídas a origem sedimentar além da influência da industrialização. Os sedimentos podem representar um sério fator de risco para a qualidade da água devido às trocas biogeoquímicas (TOKATLI, 2019). Portanto, a investigação da qualidade dos sedimentos é um componente essencial e principal na pesquisa de avaliação de ecossistemas aquáticos.

Os resultados da análise de compostos químicos no sedimento são apresentados na tabela 5. Em relação ao sedimento, também não foi detectada a presença de fármacos ou pesticidas; entretanto, foi detectada a presença de Al, Cu, Mn e Zn e em concentrações superiores as determinadas na água nos dois pontos e nas duas épocas do ano. Além disso, no período chuvoso o P2 apresentou as maiores concentrações de metais em relação ao P1 e no período seco, o Cu e o Mn foram os metais com as concentrações mais altas em relação ao P1. A

prevalência dos metais investigados pode ser apresentada no período chuvoso como Al > Zn > Mn > Cu em P1 e Al > Mn > Cu > Zn em P2. No período seco a relação entre os metais foi Al > Zn > Mn > Cu em P1 e Al > Cu > Mn > Zn em P2.

Comparando os resultados obtidos dos diferentes períodos, as concentrações de metais no período seco são significativamente menores que no período chuvoso, sendo cerca de 20 a 50% menores em suas concentrações. Como no caso do Al no P2, no período chuvoso com a concentração de 182,81 mg.kg⁻¹ e no período seco de 66,41 mg.kg⁻¹, já no P1 é possível notar que a diferença entre os períodos é significativamente menor.

Tabela 5. Parâmetros físico e químicos e valores médios dos contaminantes químicos analisados no período chuvoso (março) e seco (agosto) nas duas amostras de sedimento (P1 e P2) e o limite estabelecido pela resolução CONAMA 454/12. *indica diferença significativa em relação ao P1; #indica diferença significativa em relação aos P1 e P2 entre os períodos março e agosto. LQ = limite de quantificação.

Sedimento	CONAMA	Chuvoso - Março		Seco - Agosto	
		Ponto 1	Ponto 2	Ponto 1	Ponto 2
Alumínio (mg/kg)	-	105,49±0,60	182,81±1,58*	78,05±4,6 [#]	66,41±3,52* [#]
Cádmio (mg/kg)	0,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobre (mg/kg)	35,7	0,612±0,08	2,03±0,31*	0,487±0,03 [#]	1,70±0,23*
Manganês (mg/kg)	-	0,844±0,04	4,01±0,47*	0,547±0,03 [#]	0,947±0,10* [#]
Zinco (mg/kg)	123	1,02±0,05	0,834±0,10*	0,713±0,04 [#]	0,566±0,05* [#]

Fonte: Autora

Segundo Cantinho (2016) os contaminantes podem se concentrar nos sedimentos dos reservatórios, rios e lagos e são considerados como um compartimento de acúmulo de contaminantes e indicadores de contaminação aquática (BONAI *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2018). Estudos como os de Oliveira *et al.* (2018) demonstraram a concentração de metais nos sedimentos do lago Água Preta (PA), como Cr e Ni em quantidades que caracterizam contaminação; já os metais Cd, cobalto (Co) e Zn foram encontrados em quantidades abaixo do nível de efeito de contaminação, Rabello *et al.* (2018) encontraram nos sedimentos superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas (R.J.) metais como Hg, Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, As e Cd.

As concentrações dos metais, Cu, Mn e Zn detectadas neste estudo foram mais altas que as relatadas por Espíndola *et al.* (2004) no sedimento do reservatório de Salto Grande (S.P.) e por Bonai *et al.*, (2009) na reserva de Itá (S.C.). Neste caso, embora os metais na água estejam em concentrações abaixo do permitido pelo CONAMA, os animais que vivem neste ambiente estão continuamente expostos a estes compostos químicos via sedimento. Os metais atingem os sistemas aquáticos como consequência de atividades industriais, agrícolas e antropogênicas;

portanto, os organismos aquáticos são expostos a uma quantidade significativa desses poluentes (HEATH, 1995). O Al é o metal mais abundante na Terra e ocorre principalmente como óxido e silicato de alumínio (SCANCAR *et al.*, 2004), sendo encontrado no ar atmosférico das grandes cidades e áreas industrializadas (CASARINI *et al.*, 2001; CAMARGO *et al.*, 2009) e usado como agente de floculação no tratamento de água (SILVA *et al.*, 2007). As altas concentrações de Mn estão relacionadas principalmente às características geoquímicas da drenagem das bacias hidrográficas e a um manejo inadequado do solo. O Cu e o Zn são micronutrientes essenciais em vários processos fisiológicos em baixas concentrações, mas podem ser tóxicos em altas concentrações (CARVALHO *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2017; ANNI *et al.*, 2019).

A toxicidade dos metais no sedimento pode ser afetada pelas conexões entre os íons dos metais e os constituintes do sedimento e a sua disponibilidade (BONAI *et al.*, 2009). Assim, metais com fraca associação ligados ao sedimento podem ser facilmente quebrados pela biota, tornando-se biodisponíveis (BONAI *et al.*, 2009). Esses resultados corroboram os aqui observados, com aumento de metais na água em P2 no final da exposição. Entretanto, de acordo com os estudos feitos por Nóbrega *et al.* (2017), os períodos de estiagem aumentam a concentração de xenobióticos no sedimento, como os metais, por exemplo.

A água e o sedimento nos dois pontos e períodos analisados apresentaram concentrações diferenciadas para os compostos avaliados. Embora estejam em concentrações baixas evidenciam os crescimentos populacional e industrial na região.

5.2 Biomarcadores Bioquímicos

Os biomarcadores do estresse oxidativo, embora alguns sejam inespecíficos, fornecem indicadores significativos de poluição nos ecossistemas aquáticos (Van der Oost *et al.*, 1994, 2003).

Vários estudos reportaram a presença do fármaco paracetamol em águas superficiais (ALMEIDA; WEBER, 2006; CAMPANHA *et al.*, 2015) e em efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) (AMÉRICO *et al.*, 2012). Estudos realizados por Guiloski *et al.* (2017) em peixes da espécie *Rhamdia quelen*, após exposição crônica (21 dias) ao paracetamol, verificaram aumento na atividade de superóxido dismutase (SOD) enzima relacionada ao estresse oxidativo e a associação de diclofenaco e acetaminofeno = paracetamol, na concentração de 100 µg.L⁻¹, causou redução na atividade enzimática da catalase (CAT) em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao fármaco durante 96 h, conforme estudado por Nava-

Álvarez *et al.* (2014). Almeida e Webber (2006) demonstraram que o ibuprofeno causou efeito genotóxico em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* expostas durante 2 e 10 dias ao fármaco.

Embora esses compostos químicos não tenham sido detectados na água e no sedimento do rio Sorocaba, este ambiente é suscetível à atividade humana, uma vez que a economia se baseia na agricultura, atividades agrícolas e pecuárias intensivas nas terras ao redor do rio. A presença desses compostos pode gerar resíduos que causam contaminação da água e afetam a biota aquática. A área circundante ao rio Sorocaba é caracterizada por intensa atividade agrícola e pecuária, embora ainda sejam encontrados pontos isolados da vegetação nativa ao longo da região.

Os fármacos podem ser degradados por meio de processos bióticos (filtros biológicos ou outros) e abióticos (oxidação, hidrólise ou fotólise). Entretanto, os produtos de degradação são também compostos preocupantes, pois podem ter uma toxicidade equivalente ou superior àquela do fármaco original (ANDREOZZI *et al.*, 2003). Estudos realizados por Américo *et al.* (2012) revelaram que as substâncias presentes nos fármacos são persistentes no ambiente e não são efetivamente removidas pelos tratamentos convencionais nas ETEs. Portanto, a presença dos fármacos ou seus produtos de degradação/decomposição no ambiente aquático torna-se cada vez mais comum e mostra a necessidade de monitoramento destes compostos a fim de evitar riscos para a saúde animal e humana.

No que se refere aos metais e seus efeitos nos organismos aquáticos estes podem agir diretamente sobre os organismos e/ou formar EROs, iniciando processos degenerativos e causando efeitos genotóxicos e danos nos tecidos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1985, CARVALHO *et al.*, 2012, MACHADO *et al.*, 2013, PROKIC *et al.*, 2016, ZEBRAL *et al.*, 2019). Na presença de metais de transição, como o Fe e o Cu, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem gerar radical hidroxil ($\cdot OH$) por meio da reação de Fenton (STOREY, 1996). Outros íons metálicos não transicionais também podem estar implicados na geração de EROs na mitocôndria, como o Cd (STOHS *et al.*, 2000).

Os resultados de medições de dano oxidativo no fígado de *L. catesbeianus*, verificados por níveis de metalotioneína (MT) e de proteínas carboniladas (PCO), indicaram diferença significativa após exposição a água do rio Sorocaba entre o controle e entre os dois pontos no período chuvoso (Tabela 6). Os níveis da peroxidação lipídica (LPO) não foram diferentes do grupo controle no período chuvoso e foram diferentes significativamente em relação ao controle e entre os dois pontos no período seco.

Tabela 6 - Concentração de metalotioneína (MT), de proteínas carboniladas (PCO) e de peroxidação lipídica (LPO) no fígado de *L. catenulatus*, para os períodos chuvoso e seco. Os valores são representados como média \pm D.P.M. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle; # indica diferença significativa em relação aos pontos 1 e 2 ($p < 0,05$); ^a indica diferença significativa em relação ao período chuvoso. n = 8.

Parâmetros	Março (chuvoso)		
	Controle	P1	P2
MT ($\mu\text{g por mg de proteína}^{-1}$)	0,190 \pm 0,05	0,157 \pm 0,04*	0,251 \pm 0,03*#
PCO (nmol por mg de proteína ¹)	0,0025 \pm 0,0007	0,0028 \pm 0,0005	0,0032 \pm 0,007*#
LPO (nmol por mg de proteína ¹)	0,048 \pm 0,02	0,049 \pm 0,01	0,048 \pm 0,01
	Agosto (seco)		
MT ($\mu\text{g por mg de proteína}^{-1}$)	0,492 \pm 0,025 ^a	0,471 \pm 0,014 ^a	0,339 \pm 0,011 [#]
PCO (nmol por mg de proteína ¹)	0,0009 \pm 0,0005 ^a	0,0009 \pm 0,0006 ^a	0,0006 \pm 0,0004* ^{#a}
LPO (nmol por mg de proteína ¹)	0,0021 \pm 0,001 ^a	0,0011 \pm 0,0009* ^a	0,0039 \pm 0,0003* ^{#a}

Fonte: Autora.

No método descrito por Viarengo (1997), a concentração de MT é determinada por meio dos resíduos de SH, sendo assim os resultados obtidos por esta técnica mostram que no ponto 2 há uma maior quantidade desta proteína quando comparado ao controle e ao P1 no período chuvoso. Portanto, é possível inferir que os metais detectados na água e no sedimento em P2 induziram um aumento significativo de MT no fígado destes animais em comparação com o controle. Enquanto que em P1 a concentração de MT diminuiu significativamente em relação ao controle, durante o período chuvoso.

Já no período seco, houve diferença significativa entre P1 e P2 para esta proteína quando comparados entre si, podendo-se inferir que os metais presentes induziram a produção de MT em P1. Este aumento pode ser atribuído à presença dos metais, tanto na água quanto no sedimento, uma vez que a concentração de metal no P1 foi maior que no P2, explicando a concentração elevada de MT em P1. O aumento da MT também indica a assimilação desses metais do meio e consequente resposta fisiológica a fim de mediar os efeitos tóxicos desses compostos em girinos de rãs-touro.

Comparando os resultados obtidos entre os períodos chuvoso e seco, houve aumento na concentração de MT no período seco de 1,3 a 2,5 vezes tanto em P1 como em P2, possivelmente ocasionado pela presença dos metais na água e no sedimento. O contrário foi observado por Rocha (2017), que verificou aumento de MT no hepatopâncreas de caranguejos, *Ucides cordatus*, coletados do mangue de São Marcos, Maranhão no período chuvoso em relação ao

seco e a presença dos seguintes metais no mangue, Fe, Mn, Cu e Zn. As diferenças entre estes resultados podem ser explicadas em virtude das estratégias de bioacumulação, alimentação e distribuição no ambiente para cada espécie e também às diferenças na concentração e tipos de metais encontrados no ambiente. No caranguejo a absorção pode ocorrer pelas brânquias, através do contato com a água, ou pelo intestino, pela ingestão das folhas de mangue (serrapilheira) e do próprio sedimento (ROCHA, 2017). Para o caso dos girinos, devido às suas características (pele e ovos permeáveis e ciclo de vida bifásico), eles podem absorver (através da pele e brânquias) os metais e outros compostos químicos concentrar em seus organismos podendo ter efeitos no seu desenvolvimento.

Alinhando o resultado da análise da água com o resultado obtido no método de quantificação de MT, é possível associar seu aumento com a presença de metais na água, já que sua principal função é a ligação com os metais, impedindo que eles interfiram em reações químicas na célula e também auxiliando na eliminação deles do organismo. A MT desempenha um papel essencial na proteção de organismos aquáticos contra os efeitos da exposição aos metais. Estudos relacionam aumento da MT em presença de metais em peixes (OLIVEIRA, 2016; VIEIRA, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019; SAVASSI, 2019) e em girinos (VASCONCELOS, 2014; SÁ, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017), corroborando os nossos resultados.

Portanto, o aumento na concentração da MT pode estar associado ao aumento do estresse oxidativo por metais no fígado de *L. catesbeianus*. Esses resultados comprovam que a MT é um biomarcador importante e que elimina e/ou reduz os efeitos tóxicos dos metais (MONTEIRO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2017). Além disso, devido ao seu alto teor de grupamentos -SH, a MT também exibe a atividade de eliminação de EROs como parte do sistema de defesa antioxidante das células (VIARENGO *et al.*, 1997; VIARENGO *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2017). O presente estudo, portanto, aponta a MT como um biomarcador sensível no fígado de girinos de rãs-touro.

Além da MT, outros parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para a detecção de estresse ambiental, refletindo as respostas biológicas adversas às substâncias ambientais antropogênicas (HEATH, 1995; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Como já descrito anteriormente, os metais podem aumentar a produção de EROs e provocar estresse oxidativo, o qual pode levar à disfunção em proteínas/enzimas. Portanto, a oxidação de proteínas medida como conteúdo de proteína carboniladas (PCO) também pode ser utilizada como um potencial biomarcador de dano oxidativo (THÉROND *et al.*, 2000; PARVEZ; RAISUDDIN, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2010, CATTANEO *et al.*, 2011,

MACHADO *et al.*, 2014). Os grupos carbonilas são formados pela oxidação direta de cadeias laterais de aminoácidos por metais ou por EROs e também por ação de produtos de peroxidação lipídica (THÉROND *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Poucos estudos relacionam efeitos de contaminantes na concentração de PCO em organismos aquáticos. Monteiro *et al.* (2010) descreveram aumento de PCO em matrinxã, *Brycon amazonicus*, após exposição ao mercúrio inorgânico e Cattaneo *et al.*, 2011 verificaram aumento de PCO no fígado de *Cyprinus carpio* expostas a herbicidas comerciais contendo clomazone em campos de arroz. Outros estudos relacionam estresse térmico com formação de PCO (MACHADO *et al.*, 2014; ALMROTH *et al.*, 2015).

O aumento significativo de PCO observado em P2 em relação ao controle e ao P1 pode ser uma resposta atribuída à presença dos metais, indicando que as proteínas foram submetidas a danos oxidativos neste grupo, no período compreendido como chuvoso. Já no período seco, o controle e o P1 tiveram um aumento significativo das PCOs, em relação ao P2, indicando que os danos oxidativos ocorreram com maior significância em P1 do que em P2. Essas respostas podem ser relacionadas à capacidade dos metais, principalmente do Cu, em gerar EROs através da reação de Fenton (HERMES-LIMA, 2004; CARVALHO *et al.*, 2015, SIMONATO *et al.*, 2016). Comparando os resultados obtidos entre os períodos chuvoso e seco, houve um aumento significativo na concentração de PCO no período chuvoso de 3 a 5 vezes tanto no controle, P1 e em P2.

Assim, a carbonilação de proteínas, que resulta em oxidação das mesmas, pode estar ligada a níveis aumentados de radicais devido à formação de EROs que, por sua vez, podem atacar diretamente as proteínas e levar à formação de PCOs. Nossos resultados estão de acordo com os de Parvez e Raisuddin (2005), que observaram estresse oxidativo e níveis aumentados de PCO em peixes (*Channa punctata*) expostos a diferentes pesticidas e de Monteiro *et al.* (2010) em matrinxã, *Brycon amazonicus*, expostos ao mercúrio inorgânico e Cattaneo *et al.* (2011) no fígado de *Cyprinus carpio* expostas ao clomazone.

Além disso, níveis aumentados de PCO indicam que o metabolismo normal da proteína foi interrompido. A formação de derivados carbonílicos não é um processo reversível e provoca alterações conformacionais, diminuição da atividade catalítica das enzimas e, eventualmente, resultando em quebra de proteínas por proteases devido ao aumento da suscetibilidade (ALMROTH *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2010). Portanto, esse biomarcador pode ser utilizado para verificar efeitos de contaminantes no ambiente, pois respondeu à presença de metais no ambiente em fígado de girinos de rãs-touro.

A peroxidação lipídica (LPO) é um indicador de dano oxidativo celular e contribui na perda da função celular em condições de estresse oxidativo (STOREY, 1996). Embora os resultados mostrem um quadro de estresse oxidativo (MT e PCO), os níveis de LPO não foram alterados nos animais expostos a água em P1 e P2 em comparação com o controle, no período chuvoso (tabela 6). Já no período seco, houve diferença significativa entre os grupos, sendo P2 com concentração significativamente maior que P1 e controle. Comparativamente entre os períodos os níveis de LPO foram maiores no período chuvoso em todos os pontos, mostrando que o quadro de estresse oxidativo foi maior no período chuvoso cerca de 20-40 vezes, que no período seco. É importante ressaltar que este estudo avaliou os níveis de LPO por equivalentes de HP (hidroperóxidos de lipídeos) pelo método de FOX, enquanto que o método por TBARs (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrtico), utilizado para verificar quadro de estresse oxidativo e produção de EROs, mede os produtos finais da peroxidação lipídica, como o MDA (malondialdeído). Portanto, o método utilizado (FOX) não detecta todos os radicais gerados nos tecidos, mas isso não quer dizer que não esteja ocorrendo produção de radicais e de EROs nestes organismos. Entretanto, independentemente do método utilizado, é possível verificar um quadro de estresse oxidativo por PCO nos girinos expostos à água do rio Sorocaba.

Estudos relacionam o aumento de LPO com exposição aos metais, como os de Milaeva (2006) no fígado do esturjão (*Acipenser gueldenstaedti*) e de Monteiro *et al.* (2010) em fígado, brânquias e coração de matrinxã, (*Brycon cephalus*) expostos ao mercúrio inorgânico e de Carvalho (2015) em fígado, brânquias e músculo de curimatá, (*Prochilodus lineatus*), expostos ao cobre.

Ademais, provavelmente parte dos radicais produzidos pela presença de metais foram combatidos pelas enzimas envolvidas no estresse oxidativo, que não foram determinadas neste estudo, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) e também pelos antioxidantes não enzimáticos como a GSH e a MT. Entretanto, esses antioxidantes, provavelmente, não foram suficientes para evitar a carbonilação das proteínas no fígado dos girinos.

Os resultados obtidos mostram que os metais induziram um quadro de estresse oxidativo no fígado de girinos de rãs-touro e que foram suficientes para prejudicar as funções das proteínas essenciais para manter a homeostase celular.

6 Conclusões

Os resultados apresentados mostram que a água e o sedimento do rio Sorocaba apresentam metais (Al, Cu, Mn e Zn), e que estes estão abaixo do permitido pela resolução CONAMA (2005); embora estejam abaixo do limite permitido os metais provocaram uma resposta de estresse oxidativo, no fígado de girinos de rãs-touro, verificados pelos biomarcadores MT e PCO; a presença de metais na água e no sedimento podem ser relacionadas com as respostas bioquímicas (MT e PCO) no fígado dos girinos em processos de desintoxicação;

Não foi detectada a presença de agrotóxicos e fármacos na água e no sedimento do rio Sorocaba;

A concentração dos metais variou sazonalmente com as maiores concentrações de metais observadas no período chuvoso em relação ao período seco e que o uso do solo influencia na qualidade da água e estas diferenças podem afetar a comunidade aquática e a saúde humana;

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que ambos os pontos 1 e 2 encontram-se impactados por contaminantes com potencial tóxico e, além disto, os girinos mantidos na água em P2 apresentaram alterações biológicas mais significativas quanto aqueles mantidos em P1;

A avaliação da qualidade da água de uso público e o uso de biomarcadores são importantes para verificar o efeito de diferentes contaminantes no organismo; sendo assim, os biomarcadores bioquímicos utilizados mostram que é possível aplicá-los e relacioná-los com a contaminação aquática e a variação destes parâmetros pode levar a alterações na fisiologia dos anuros e comprometer o seu desenvolvimento.

6 Referência

- ABDALLA, F.C.; DE ANDRADE, F.L.N.; COSTA, M.J.; SALLAR, R.F. Efeito do cádmio no fígado de girinos de rã-touro. *Revista Eletrônica Científica da Uergs*, v. 3, n. 2, p.447-471, 2017.
- ABDEL-MONEIM, A.M., AL-KAHTANI, M.A., ELMENSHAWY, O.M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere* 88 (8), 1028-1035. 2012.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Em *Handbook of Ecotoxicology*; Hoffman, D. J.; Rattner B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns Jr., J., eds.; 2nd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, cap. 2., 2003
- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1523, p. 37-48, 2000.
- AITIO, A.; BERNANRD, A.; FOWLER, A.; NORDBERG, G. Biological monitoring and biomarkers. In: *Handbook on the toxicology of metals* (G. Nordberg, B. Fowler, M. Nordberg and L. Friberg, Eds.). 3rd ed. Academic Press/Elsevier, 975 pp. 2007.
- AL MEHDI, A.B., DODIA, C., JAIN, M.K., FISHER, A.B.A. phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1166, p.56-62, 1993.
- ALIJANI, R. A.; MOVAHEDINIA, A.; RASTGAR, S. Fish Liver Biomarkers for Heavy Metal Pollution: A Review Article. *American Journals of Toxicology*, 2, 1-8. 2017.
- ALMEIDA, G.A.; WEBER, R.R. Fármacos na represa Billings. *Ambiente e Saúde*, Joinville, v. 6, n. 2, p. 7-13, 2006.
- ALMROTH, B.C., STURVE, J., BERGLUND, A., FORLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyl and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 73, 171-180. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.007. 2005.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, Water Environment Federation; *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association: Washington, 1998.
- AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P.; ISIQUE, W.D.; TORRES, N.H.; MACHADO, A.A.; CARVALHO, S.L.; VALÉRIO FILHO, W.V.; FERREIRA, L.F.R. Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 429-235, maio/jun. 2017.
- AMPHIBIA WEB. Science Zone of The Dasa. Disponível em: < <https://amphibiaweb.org/> > Acesso em: 15/09/19.

- ANDRADE, E.M.; ARAÚJO, L.de F.P.; ROSA, M.F.; DISNEY, W.; ALVES, A.B. Seleção dos indicadores da qualidade das águas superficiais pelo emprego da análise multivariada. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v.27, n.3, p. 683-690, 2007.
- ANDREOZZI, R.; RAFFAELE, M.; NICKLAS, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50 (10), 1319-1330. 2003.
- ANNI, I.S.A.; ZEBRAL, Y.D.; AFONSO, S.B.; ABRIL, S.I.M.; LAUER, M.M.; BIANCHINI, A. Life-time exposure to waterborne copper III: effects on the energy metabolism of the killifish *Poecilia vivípara*. *Chemosphere* 227, 580-588. 2019.
- ARAUJO, R.P.A.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; SILVÉRIO, P.F.; ALMEIDA, F.V.; RODRIGUES, P.F.; UMBUZEIRO, G.A.; JARDIM, W.F.; MOZETO, A.A. Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.25, n.2, p. 581-588, 2006.
- ARAUJO-VIEIRA, K.; LACERDA, J. V. A.; PEZZUTI, T. L.; LEITE, F. S. F.; ASSIS, C. L.; CRUZ, C. A. G. A new species of hatchet-face treefrog *Sphaenorhynchus Tschudi* (Anura: Hylidae) from Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, southeastern Brazil. *Zootaxa*, v. 4059, p. 96-114. 2015.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS; Norma Técnica NBR15088, *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes*, 2ª. ed., Rio de Janeiro, 2004.
- 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). In: *Annual Book of Standards*, v. 11.05, Section 11. Philadelphia, PA, p. 220-240. 2000.
- ATLAS BRASIL: Abastecimento Urbano de Água: Panorama Nacional/Agência Nacional de Águas; Engecorps/ Cobrape – Brasília: ANA: Engecorps/ Cobrape, 2010. Disponível em: <<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/Download.aspx>>
- ATLI, G., CANLI, M.; Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 73. 2010.
- AVMA - American Veterinary Medical Association, 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. *Journal of American Veterinary Society* 218, 669-696.
- AWKERMAN, J; RAIMONDO, S; SCHOMOEK, A; GALIC, N; RUEDA-CEDIEL, P; RAPO, K; ACCOLA, C; VAUGEOIS, M; FORBES, V. Guidance for developing amphibian population models for ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2019.
- BAIRD, C. *Química ambiental*. Trad. M.A.L. Recio e L.C.M. Carrera. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BARBER, A.A., BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Advances in Gerontological Research.*, v.2, p.355-403, 1967.

BEISWENGER, R.E. Integrating anuran amphibian species into environmental assessment programs, p.159-165. In: SZARO R.C.; SEVERSON, K.E.; PATTON, D.R. (Ed.). Management of Amphibians, Reptiles, and Small Mammals in North America: Proceedings of the Symposium. Arizona, USDA Forest Service, General Technical Report RM-166, 458 p. 1988.

BELGIORNO, V.; RIZZO, L.; FATTA, D.; ROCCA, C.D.; LOFRANO, G.; NIKOLAOU, A.; NADDEO, V.; MERIC, S. Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination* 215. 166-176. 2007.

BENEDETTI, M.; GIULIANI, M.E.; REGOLI, F. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: Molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1340, n. 1, p. 8-19, 2015.

BENITES, L.M.; DONCATO, K.B.; MINHO, T.S.; PERAZZO, G.X. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. *Ciência e Natura*. [Internet], v. 36, n. 2, p. 107-113, 2014.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 272, n. 33, p. 20313-20316, 1997.

BHADURI, A.; BOGARDI, J.; LEENTVAAR, J.; MARX, S. The Global Water System in the Anthropocene. *Challenges for Science and Governance*. Book. 2014.

BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40 (12), 1335-1351. 2000.

BONAI, N.C.; SOUZA-FRANCO, G.M.; FOGOLARI, O.; MOCELIN, D.J.C.; DAL MAGRO, J. Distribution of metals in the sediment of the Itá Reservoir, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*. v. 21, n. 2, p. 245-250. 2009.

BORTOLUZZI, E.C.; RHEINHEIMER, D.S.; GONÇALVES, C.S.; PELLEGRINI, J.B.R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A.C.C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo - RS. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.10, n.4, p.881-887, 2006.

BORTOLUZZI, E.C.; RHEINHEIMER, D.S.; GONÇALVES, C.S.; PELLEGRINI, J.B.R.; MARONEZE, A.M.; KURZ, M.H.S.; BACAR, N.M.; ZANELLA, R. Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.8, p.1.872-1.876, 2007.

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

BRAGA, L.G.T.; LIMA, S.L. 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, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518/ de 25 de março de 2004. Brasília, 2004.

- BRAUCKMANN, B.M. Industrial solutions amenable to biosorption. In: VOLESKY, B. (Ed.). Biosorption of heavy metals. Boca Raton: CRC Press, cap. 1. 4. p. 51-64. 1990.
- BRZÓSKA, M.M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. Food and Chemical Toxicology, v.39, p. 967-980, 2001.
- BUENO, L.F.; GALBIATTI, J.A.; BORGE, M.J. Monitoramento de variáveis de qualidade da água do horto Ouro Verde - Conchal - SP. Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v.25, n.3, p.742-748, 2005.
- BURGER, J.; SNODGRASS, J. Metal levels in southern leopard frogs from the Savannah River Site: location and body compartment effects. Environmental Research, Baltimore, 86(2): 157-166. 2001.
- CAJUSTE, L.J.; CARRILLO, G.R.; COTA G.E.; LAIRD, R.J. The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. Water, Air, and Soil Pollution, v. 57- 58, p. 763-771, 1991.
- CALAPOGLU, M.; SEVINC, Z.; TOGAY, V.A.; KALYONCU, H. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity for environmental monitoring using farmed rainbow trout. Fresenius Environmental Bulletin, v. 26, n. 12, p.7105-7113. 2017.
- CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. Aquatic Toxicology 94, 40-46. 2009.
- CAMPANHA, M.B.; AWAN, A.T.; DE SOUSA, D.N.; GROSSELI, G.M.; MOZETO, A.A.; FADINI, P.S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. Environmental Science and Pollution Research International, v. 22, n. 10, p. 7936-7947, 2015.
- CARDOSO, L.M.N.; CHASIN, A.A.M. Ecotoxicologia do Cádmio e Seus Compostos. Bahia: Série Caderno de Referência Ambiental, 2001.
- CARL, G.F.; GALLAGHER, B.B. Manganese and epilepsy. In Manganese in Health and Disease, Klimis-Tavantzis DJ (ed.). CRC Press: Boca Raton, FL, 1994; 133-143.
- CARVALHO, C.S.; UTSUNOMIYA, H.S.M.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; COSTA, M.J.; FERNANDES, M.N. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. Environmental Pollution, v. 221, p. 445-452, 2017.
- CARVALHO, C.S.; ARAUJO, H.S.S.; FERNANDES, M.N. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and 8.0. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 137, 225-234. 2004.
- CARVALHO, C.S.; BERNUSSO, V.A.; FERNANDES, M.N. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). Aquatic Toxicology, v.167, p. 220-227. 2015.

CARVALHO, M.M; LIRA, V.S; WATANABE, C.H; FRACÁCIO, R. 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. 2017.

CASARINI, D.C.P.; DIAS, C.L.; ALONSO, C.D. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Série Relatórios. CETESB, São Paulo. 2001.

CASSEMIRO, F.A.S.; GOUVEIA, S.F.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Distribuição de *Rhinella granulosa*: integrando envelopes bioclimáticos e respostas ecofisiológicas. Revista da Biologia 8, 38-44. 2012.

CATTANEO, R.; MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; SARTORI, G.M.S.; CLASEN, B.; AVILA, L.A.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 62 (1), 97-106. 2011.

CHANGE, B., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiological Reviews, v.59, n.3, p. 527-605, 1979.

CHERIAN, M.G.; JAYASURYA, A.; BAY, B.H. Review Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. Mutation Research. v. 533, n. 1/2, p. 201-209, 2003.

CHIBA, W.A.C.; PASSERINI, M.D.; BAILO, J.A.F.; TORRES, J.C.; TUNDISI, J.C. Seasonal study of contamination by metal in water and sediment in a sub-basin in the Southeast of Brazil. Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia, vol. 71, no. 4, pp. 833-843. 2011.

CIANCIARUSO, M.V.; SILVA, I.A.; BATALHA, M.A. Diversidades filogenética e funcional: novas abordagens para a ecologia de comunidades. Biota Neotropica. Campinas 9, 1-11. 2009.

CLASEN, B.; LORO, V.L.; CATTANEO, R.; MORAES, B.; LÓPES, T.; AVILA, L.A.; ZANELLA, R.; REIMCHE, G.B.; BALDISSEROTTO, B. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice-fish cultivation. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 77, p. 45-51, 2012.

COMPANHIA BRASILEIRA DE ALUMÍNIO (CBA). Dados de vazão e precipitação. Estação meteorológica na Represa de Ituparanga, Votorantim (SP). 2006.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Resolução no. 357, de 17 de março de 2005, pp. 1-23. 2005.

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

- CONCEIÇÃO, F.T.; SARDINHA, D.S.; NAVARRO, G.R.B.; ANTUNES, M.L.P.; ANGELUCCI, V.A. Composição química das águas pluviais e deposição atmosférica anual na bacia do alto Sorocaba (SP). *Química Nova* 34 (4), 610-616, 2011.
- CONSTANTINOV, G.N. Novos paradigmas dos créditos ambientais. In: FARIAS, T.; COUTINHO, F. S. N. (Coord.). *Direito Ambiental: o meio ambiente na contemporaneidade*. Belo Horizonte: Forum, 2010.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*. V.31, p.1820-1830. 2008.
- CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed.* 17, 544-553. 2004.
- DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169-176. 2003.
- DIKALOV, S., GRIENGLING, K.K., HARRISON, D.G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 49 (4), 717-727. 2007.
- DOMINGUES, C.E. Determinação de metais em tilápia (*Oreochromis niloticus*), água e sedimento de um reservatório na cidade de Ponta Grossa - PR e avaliação toxicológica por estudo de estresse oxidativo. 2015.
- DONADIO, N.M.M.; GALBIATTI, J.A.; PAULA, R.C. de. Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na bacia hidrográfica do Córrego Rico. São Paulo, Brasil. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v.25, n.1, p.115-125, 2005.
- DORNELLES, M.F; OLIVEIRA, G.T. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidations and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of environmental contamination and toxicology*. V.66. 2014.
- DORNFELD, CB., LEITE, MA. and ESPÍNDOLA, ELG. Caracterização física e química do sedimento do reservatório de Salto Grande, Americana, SP.
- DUELLMAN, W.E.; MARION, A.B.; BLAIR, H.S. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104 (1), 001-109. 2016.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. (1986). *Biology of amphibians*. McGraw-Hill Publishing Company, New York. 670p. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. v. 19, n. 1, p. 13 - 17, 2005.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77. 1959.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*.v.7, p. 88-96, 1961.

- ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): caracterização, impactos e propostas de manejo. In: Lopes, A.A., Yuba, A.N., Santos, C., Oliveira, M.C., Minillo, A. Barbosa, D.S. (Orgs.). Reservatório de Salto Grande: A influência do desenvolvimento econômico industrial na degradação da qualidade da água do reservatório de Salto Grande. São Carlos: Rima, 2005.p. 19-36.
- ESTEVES, F.A. Fundamentos de Limnologia. 1988. In: ZAGATTO, P.A; BERTOLETTI, E. (Eds) Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. Rima, São Carlos, 2006.
- FALFUSHINSKA, H.; LOUMBOURDIS, N.; ROMANCHUK, L.; STOLYAR, O. Validation of oxidative stress response in two populations of frogs from Western Ukraine. *Chemosphere*, v. 73, p. 1096-1111, 2008.
- FERNANDES NETO, M.L.; SARCINELLI, P.N. Agrotóxicos em água para consumo humano: Uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v.14, n.1, p.69-78, 2009.
- FERREIRA, A.P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 21(6):1884-1892. 2005.
- FERREIRA, C.M. Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) como animais sentinelas. 109p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2002.
- FERREIRA, D.; MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, v. 79, p. 914-921, 2010.
- FILIPOVIĆ, V.; RASPOR, B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Research*, v. 37, n. 13, p. 3253-3262, 2003.
- FLEMMING, C.A., TREVORS, J.T. Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water Air Soil Pollution*, v. 44, p. 43-158, 1989.
- FORBES, V.E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The Use and Misuse of Biomarkers in Ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 1, p. 272, 2006.
- FRANÇA-SALGUEIRO, F.M. 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, 2013.
- FRANCO, J.; TREVISAN, R.; POSSER, T.; TRIVELLA, D.; HOPPE, R.; ROSA, J.; DINSLAKEN, D.; DECKER, H.; TASCA, C.; BAINY, R.; MARQUES, M.; BAINY, A.C.D.; DAFRE, A. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73. 864-872. 2010.

FROST, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. Versão 5.8. American Museum of Natural History, Nova York, 2008. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 4. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>> Acesso em: 18 out 2018

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Electronic Database accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2019.

GAFFNEY, V. Monitorização de fármacos na água bruta e na água para consumo humano por cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massa tandem. Doutoramento em Farmácia, Especialidade em Bromatologia. Universidade de Lisboa, Portugal. 2014.

GAFFNEY, V.D.; CARDOSO, V.V.; BENOLIEL, M.J.; ALMEIDA, C.M.M. Chlorination and oxidation of sulfonamides by free chlorine: identification and behaviour of reaction products by UPLC-MS/MS. *Journal of Environmental Management* 166, 466-477. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.10.048. 2016.

GAFFNEY, V.; ALMEIDA, C.M.M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M.J.; CARDOSO, V. V. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research* 72, 199-208. doi: 10.1016/j.watres.2014.10.027. 2015.

GAFFNEY, V.; CARDOSO, V.V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M.J.; ALMEIDA, C.M.M. Analysis of pharmaceutical compounds in waters by SPE-UPLC-ESIMS/MS. *Química Nova* 37(1) 138-149. doi: 10.1007/s12161-009-9119-7. 2014.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v.7, p.65-86, 1989.

GIBBONS, J.W. et al. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *Bioscience*, v. 50, p. 653-666, 2002.

GOERING, P.L.; WAALKES, M.P.; KLAASEN, C.D. Toxicology of cadmium. In: *TOXICOLOGY OF METALS: Biochemical aspects*. Berlin: Springer. p.189-214. 1995.

GOMES, E.G.; MACHADO, A.A.S.; HOFF, M.L.M.; BIANCHINI, A. Avaliação da lipoperoxidação em peixe como potencial biomarcador de contaminação aquática. 2011.

GOMES, M.V.T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 6, n. 1, p. 24-30. 2011.

GROSSEL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, New York*, v.133, p.287-303, 2002.

- GRÜTZMACHER, D.D.; GRÜTZMACHER, A.D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A.E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S.C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 2, p.632-637, 2008.
- GUAN, J.; WANG, J.; PAN, H.; YANG, C.; QU, J.; LU, N.; YUAN, X. Heavy metals in Yinma River sediment in a major Phaeozems zone, Northeast China: Distribution, chemical fraction, contamination assessment and source apportionment. *Scientific Reports*. v. 8, 12231. 2018.
- HADDAD, C. F. B. Uma análise da lista brasileira de anfíbios ameaçados de extinção: In: MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G.M., PAGLIA, A.P. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. 1 ed. Brasília: Fundação Biodiversitas, 1420 p. 287. 2008.
- HADDAD, C. F. B. Uma Análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.
- HADDAD, C.F.B.; PRADO, C.P.A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *BioScience* 55: 207-217. 2005.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, v. 47, p.410-418, 2000.
- HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. *The FASEB Journal*., v.1, p.358-364, 1987.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed. New York: Oxford University. p.936. 1999.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. ed. New York: Oxford University Press Inc. p. 704. 1999.
- HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research*. 533 (1-2), 211-226. 2003.
- HEATH, A.G. *Water Pollution and Fish Physiology*, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 384. 1995.
- HECNAR, S.J.; M'CLOSKEY, R.T. Changes in the composition of a ranid frog community following bullfrog extinction. *American Midland Naturalist*, Notre Dame, n. 137, p. 145-150, 1997.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 319-368. 2004.
- HILL L.W. JR., SCOTT M.C., KILLEN W.D. A screening level probabilistic ecological risk assessment of copper and cadmium in the Chesapeake Bay watershed. Report US EPA Chesapeake Bay Program Office, 1997.

- HINTON, D.E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts, 1, 224-268. 2001.
- HOWARD, R.D. Sexual dimorphism in bullfrogs. Ecology, Ithaca, v. 62, n. 2, p. 303-310, 1981.
- IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Acesso em: 30 SET 2019
- INACIO, A.F. Metalotioneína e metais em *Geophagus brasiliensis* – Acará. Rio de Janeiro, 78 p. Dissertação - Pós-Graduação da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 2006.
- IPT – INSTITUTO DE PESQUISA TECNOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO; Atualização do relatório de situação dos recursos hídricos da Bacia do Sorocaba Médio Tietê (Relatório Zero) como subsídio à elaboração do Plano de Bacia, São Paulo, 2005.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. . Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>
- JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B.L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998.
- JENSEN, A.; BRO-RASIRIUSSEN, F. Environmental cadmium in Europe. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.v.125, p.101-181. 1992.
- JIANG, Z.Y., HUNT, J.V., WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. Analytical Biochemistry. 202, 384-389. 1992.
- JIANG, Z.Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe 2+ in the presence of xylenol orange - Comparison with TBA assay and on iodometric method. Lipids, v. 26: p. 777-860. 1991.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, 2011.
- JONES, D.K., HAMMOND, J.I., RELYEA, R.A. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family level sensitivity. Environmental Toxicology and Chemistry. 28, 1939-945. 2009.
- KAIM, W., SCHWEDERSKI, B. Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of life, John Wiley & Sons Ltd, cap. 10, 187-214, 1995.
- KANTIDAS, T.; WATI, M.R.; FATIMA-SHAD, K. Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. Archives of Neurosciences. 2 (2), e60038. 2015. doi: 10.5812/archneurosci.20078.

KEEN, C.L., ENSUNSA, J.L., CLEGG, M.S. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. In *Manganese and its Role in Biological Processes*, Sigel A, Sigel H (eds). Marcel Dekker: New York, 2000; 89-121.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50. 2000.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; MCMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, W. Em *Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*; Klaassen, C. D., ed.; 6th ed., MacGraw-Hill: New York, cap. 29, 2001.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. *Methods in Molecular Biology*. 32, 9-15. 1994.

KRULL, M.; BARROS, F. Key issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: a critical review. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7(2), 69-78. <http://doi.org/10.5132/jbse.2012.02.010>. 2012.

KUBOTA, A.; BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; GOLDSTONE, J.V.; STEGEMAN, J.J. The cytochrome P450 2AA gene cluster in zebrafish (*Danio rerio*): Expression of CYP2AA1 and CYP2AA2 and response to phenobarbital-type inducers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 272(1); 172-179. 2013.

LEMOS, M.; NETO M.F.; DIAS, N.S. Sazonalidade e variabilidade espacial da qualidade da água na Lagoa do Apodi, RN. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.2, p.155-164, 2010.

LEVINE, R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 258(19), 11823-11827. 1983.

LEVINE, R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, n. 1983, p. 464-478, 1990.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 37 (3), 293-303, 2001.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. *A Criação de Rãs*, 2^oed., São Paulo: Globo, 187p., 1989.

LINDER, M.C. Copper and genomic stability in mammals. *Mutation Research*, v. 475, p. 141-152, 2001.

LÓPEZ-BAREA, J. Biomarcadores moleculares de estrés oxidativo y contaminación ambiental. *Reviews in Toxicology*, v. 17, p. 12-18, 2000.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research*, v. 399, p.3-15, 1998.

LOZI, A. Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda. UFV – Universidade Federal de Viçosa. 2019.

LUCIA, M.; ANDRÉ, 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*. 19 (1), 163-170. 2010.

MACHADO, A.A.S.; HOFF, M.L.M.; KLEIN, R.D.; CARDOZO, J.G.; GIACOMIN, M.M.; PINHO, G.L.L.; BIANCHINI, A. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquatic Toxicology*. 138-139, 60-69. 2013.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C.S.; CADENA, S.M.S.C.; GOZZI, G.J.; KREBSBACH, P.; SANT'ANNA RIOS, F.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, B* (172-173), 21-28. 2014.

MAIER, M.H. Ecologia da bacia do rio Jacaré Pepira (47°55' - 48°55'W; 22°30' - 21°55'S - Brasil): qualidade da água do rio principal. *Ciência e Cultura*, 39(2): 164-185. 1987.

MANGAL, M. J. Assessing mercury contamination in the Amazon Basin. 2001. Disponível em < www.mangal.dk/mercury.pdf > . Acesso em: 5 Ago 2019 .

MANN, R.M.; HYNE, R.V.; CHOUNG, C.B.; WILSON, S.P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 2903-2927, 2009.

MARCANTONIO, A.S; RANZANI-PAIVA, M.J.T; FRANÇA, F.M; DIAS, D.C; TEIXEIRA, P.C; FERREIRA, C.M. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 2011.

MARET, W. Metallothionein disulphide interactions, oxidative stress, and the metallothionein, and zinc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 95, p. 3489-3494, 1998.

MARGOSHES, M.; VALLEE, B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc* 79. 4813. 1957.

MARTINS, S.E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 13, 1866-1875. <http://doi.org/10.1039/c0em00787k>. 2011.

MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae) p.327-340. 2000.

- MCDIARMID, W.R.; ALTIG, R. The Tadpole Arena: In: MCDIARMID, W.R.; ALTIG, R. Tadpoles, The Biology of Anuran Larvae. 1 ed. [S.L.]: University of Chicago Press, 458 p. 1999.
- MENNILLO, E.; CASU, V.; FEDERICA TARDELLI, F.; MARCHI, DE L.; FREITAS, R., PRETTI, C. Suitability of cholinesterase of polychaete *Diopatra neapolitana* as biomarker of exposure to pesticides: In vitro characterization. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 191, p. 152-159, 2017.
- MILAEVA, E.R. The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation. Review article. Journal of Inorganic Biochemistry. v. 100 (5-6), 905-915. 2006.
- MINELLA, J.P.; MERTEN, G.H.; REICHERT, J.M.; RHEINHEIMER D.S. Identificação e implicações para a conservação do solo das fontes de sedimentos em bacias hidrográficas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, v.31, n.6, p.1.637-1646, 2007.
- MINGULA, P.; LASZCZYCA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; WILCZEK, G.; ROZPEDEK, K.; KAFEL, A.; WOLOSZYN, M. Antioxidative defense enzymes in beetles from a metal pollution gradient. Biologia Bratislava, Katowice, v. 59, n. 5, p. 645-654, jul. 2004.
- MIRANDA, A.L.C. Bioacumulação de poluentes organopersistentes (pops) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos in vitro em células do sistema imune de carpa (*Cyprinus carpio*). 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). Ecotoxicology. 19, 105-123. 2010.
- MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. Revista Saúde Pública, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.
- MOREIRA, J.C. Threats by heavy metals: human and environmental contamination in Brazil. The Science of the Total Environment, v. 188, Suppl. 1, p. 61-71, 1996.
- MORON, S.E.; POLEZ, V.L.P.; ARTONI, R.F.; RIBAS, J.L.C; TAKAHASHI, H.K. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 1, n. 1, p. 27-30, 2006.
- MOUQUET, N.; DEVICTOR, V.; MEYNARD, C.N.; MUNOZ, F.; BERSIER, L.F.; CHAVE, J.; COUTERON, P.; DALECKY, A.; FONTAINE, C.; GRAVEL, D.; HARDY, O.J.; JABOT, F.; LAVERGNE, S.; LEIBOLD, M.; MOUILLOT, D.; MUNKEMULLER, T.; PAVONINE, S.; PRINZING, A.; RODRIGUES, A.S.L.; ROHR, R.P.; THÉBAULT, E.; THILLER, W. Ecophylogenetics: advances and perspectives. Biological Reviews. 87, 769-785. 2012.
- MURRAY, K.S.; CAUVET, D.; LYBEER, M.; THOMAS J.C. Particle size and chemical control of heavy metals in bed sediment from the Rouge river, Southeast Michigan. Environmental Science and Technology v. 33, pp. 987-992, 1999.

NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, v. 35, p. 197-210, 1996.

NAVA-ÁLVAREZ, R.; RAZO-ESTRADA, A.C.; GARCÍA-MEDINA, S.; GÓMEZOLIVAN, L.M.; GALAR-MARTÍNEZ, M. Oxidative Stress Induced by Mixture of Diclofenac and Acetaminophen on Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 2, p.1-9, 2014.

NEWMAN, R.A. Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* 115 (1-2), 9-16. 1998.

NOGUEIRA, L; SANCHES, A; SILVA, D.H.; FERRIZI, V; MOREIRA, A; ALMEIDA, E.A. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere*. 85; 97-105. 2011.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46: 243-254. 1998.

NOWIS, D.; LEGAT, M.; GRZELA, T.; NIDERLA, J.; NILCZERK, E.; WILCZYŃSKI, G.M.; GLODKOWSKA, E.; MRÓWKA, P.; ISSAT, T.; DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A.; WÁS, H.; ADAMEK, M.; WRZOSEK, A.; NAZAREWSKI, S.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; JAKÓBISIAK, M.; GOLAB, J. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene, Warsaw*, v. 25, n. 24, p. 3365-3374, jun. 2006.

OLIVEIRA, G.M.T.S.; OLIVEIRA, E.S.; SANTOS, M.L.S.; MELO, N.F.A.C; KRAG, M.N. Concentração de metais pesados nos sedimentos do lago Água Preta (Pará, Brasil). *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v.23. n3. 2018.

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

OLIVEIRA, T.A.L.; SAWAYA, R.J.; DUARTE, L.D.S. Evaluating land use effect on amphibian communities. *South American Journal of Herpetology*. p. 201-209, 2003.

OLIVER, S.L.; RIBEIRO, H. Variabilidade climática e qualidade da água do Reservatório Guarapiranga. *Estudos Avançados, São Paulo*, v. 28, n. 82, p. 95-128, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142014000300007&lng=en&nrm=iso> Acesso em 13 de fevereiro de 2020.

O'NEALL, S.L.; ZHENG, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*. 2, 315-328. 2015.

PALMA, J.V.N.; FILHO, W.P.; KRAMER, G.; KAISER, E.A. Avaliação da transparência e pH do reservatório da Usina hidroelétrica Ernestina – RS. *Ciência e Natura*. V.39. p.164-170. 2017.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 26, p. 345-356, 1995.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20 (1), 112-117. 2005.

PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; NETO, A.L.O., *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. 1.ed. São Carlos, RIMA. 575p. 2000.

PEDRAZZI, F.J.M; CONCEIÇÃO, F.T; SARDINHA, D.S; MOSCHINI-CARLOS, V; POMPEO, M. Avaliação da qualidade de água no reservatório de Itupararanga, bacia Alto Sorocaba (SP). São Paulo, UNESP, Geociências, v.33, n1, p.26-38, 2014.

PEDROZO, M. DE F. M.; LIMA, I. V. DE. *Ecotoxicologia do cobre e seus compostos*. Cadernos de Referência Ambiental v. 2, Salvador, 2001.

PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CABAGNA, M.C.; ATTADEMO, A.M.; BASSO, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70, 185–197. 2008.

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

PILLAR, V.P.; DUARTE, L.D.S. A framework for metacommunity analysis of phylogenetic structure. *Ecology Letters*. 13, 587-596. 2010.

PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, v.30, n.4, p.277-290, 1995.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; JOHN, B.H. *A vida dos vertebrados*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; McFARLAND, W.N. *A vida dos vertebrados*. São Paulo: Atheneu, 1996.

PROKIC, M.D.; BORKOVIC-MITIC, S.S.; KRIZMANIC, I.I.; MUTIC, J.J.; VUKOJEVIC, V.; NASIA, M.; GAVRIC, J.P.; DESPOTOVIC, S.G.; GAVRILOVIC, B.R.; RADOVANOVIC, T.B.; PAVLOVIC, S.Z.; SAICIC, Z.S. Antioxidative responses of the tissues of two wild populations of *Pelophylax kl. esculentus* frogs to heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 128, 21-29. 2016.

RABELLO, M.V.T; CESAR, R.G.; CASTILHO, Z.; RODRIGUES, A.P.; CAMPOS, T.M.P; WASSERMAN, J.C.; POLIANOV, A. Risco ecológico potencial por metais pesados em sedimento da Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ). *Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ*. v.41, n.3. 2018.

- RAFFEL, T.R.; ROHR, J.R.; KIESECKER, J.M.; HUDSON, P.J. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology* 20, 819-828. 2006.
- RASHED, M.N.; Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environment International*, v. 27 p. 27-33, 2001.
- RELYA, R.A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, v. 15, p. 618-627, 2002.
- RELYA, R.A. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376. 2009.
- RELYEA, R.A. The effects of pesticides, pH, and predatory stress on amphibians under mesocosm conditions. *Ecotoxicology*. v. 15, n. 6, p. 503-511, 2006.
- RELYEA, R.A. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*., v. 15, p. 1118-1124, 2005.
- REQUENA, J.R.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins Review Article. *Amino Acids* 25, 221-226. DOI 10.1007/s00726-003-0012-1. 2003.
- RHEINHEIMER, D.S.; GONÇALVES, C.S.; PELLEGRINI, J.B.R. Impacto das atividades agropecuárias na qualidade da água. *Ciência & Ambiente*, Santa Maria, v.27, n.2, p.85-96, 2003.
- ROCHA, C.H.B.; AZEVEDO, L.P. Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus, Juiz de Fora (MG), Brasil. *Revista Espinhaço, UFVJM*, [S.l.], p. 33-44, mar. 2017. ISSN 2317-0611. Disponível em: <<http://revistaespinhaco.com/index.php/journal/article/view/86>>. Acesso em: 08 feb. 2020.
- ROCHA, C.H.S. Bioacumulação de metais e presença de metalotioneína no carangueijo-uçá, *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763). Universidade Federal do Maranhão - Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação. 2017.
- ROSSA-FERES, D.C.; JIM, J. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 54 (2), p. 323-334, 1994.
- SANTOS, D.R. Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios de Iraí e Passarinho. Curitiba. 2013.
- SANTOS, G.S. Avaliação dos efeitos do cobre em duas espécies de ciclídeos (*Geophagus brasilienses* e *Oreochromis niloticus*) utilizando multi-biomarcadores. Curitiba, 2017,
- SANTOS, M.A.A.; SCHMIDT, V.; BITENCOURT, V.C.; MAROSO, M.T.D. Esterqueiras: avaliação físico-química e microbiológica do dejetos suíno armazenado. *Engenharia Agrícola, Jaboticabal*, v.27, n.2, p.537-543, 2007.

- SARDINHA, D.S.; CONCEIÇÃO, F.T.; BONOTTO, D.M.; SALLES, M.H.D.; ANGELUCCI, V.A. Avaliação do balanço anual de cátions e ânions na bacia do Alto Sorocaba (SP). *Revista Brasileira de Geografia*. 38, 730-740. 2008.
- SARMA, S.S.S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 41(8), 1417-1430. <http://doi.org/10.1080/03601230600964316>. 2006.
- SAVASSI, L.A. Efeitos da contaminação por metais pesados e biomarcadores de impacto ambiental em peixes da bacia do rio São Francisco, MG – Manuscrito Doutorado. 2019.
- SBH - Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <http://www.sbhherpetologia.org.br/checklist.anfibios.htm>. 2005.
- SCANCAR, J.; STIBIJ, V.; MILACIC, R. Determination of aluminium in slovenian foodstuff and its leachability from aluminium-cookware. *Food Chemistry*., 151-157. 2004.
- SCHLENK, D.; GIULIO, R. T. DI; HINTON, D. E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 683-732. 2008.
- SCHLENK, D.; DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. *Aquaculture*, v. 177, n. 1-4, p. 367-379, 1999.
- SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V.; GRIFFIS, W.L.; WILSON, K.N. Teratogenesis, toxicity, and bioconcentration in frogs exposed to dieldrin. *Bulletin Archives of Environmental Contamination Toxicology*, New York, 21: 332-350. 1991.
- SEGALA, Mariana. Água a escassez na abundância Guia Exame Sustentabilidade, p. 40-47, 2012.
- SETH, R.B.; EA, C.; CHEN, Z.J. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell*, Dallas, v. 122, n. 9, p. 669-682, sep. 2005.
- SILVA, M.A.; ARAÚJO, R.R. Análise da qualidade de água no córrego Limoeiro e no rio Pirapozinho no estado de São Paulo – Brasil. *Revista Formação (ONLINE)*. v.1. n.24. 2017.
- SILVA, T. Avaliação Ecológica do Efeito Combinado de Contaminantes Ambientais. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. 2013.
- SILVA, V.S.; NUNES, A.M.; CORDEIRO, M.J.; CALEJO, A.I.; SSANTOS, S.; NEVES, P.; SYKES, A.; MORGADO, F.; DUNANT, Y.; GONÇALVES, P.P. Comparative effects of aluminum and ouabain on synaptosomal choline uptake, acetylcholine release and (Na⁺/K⁺) ATPase. *Toxicology* 236, 158-177. 2007.
- SIMONATO, J.D.; MELA, M.; DORIA, H.B.; GUILOSKI, I.C.; RANDI, M.A.F.; CARAVLHO, P.S.M.; MELETTI, P.V.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 170. 2016.

SMART, R.C.; HODGSON, E. Molecular and biochemical toxicology. 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2008.

SOGORB, M.A.; PAMIES, D.; LAPUENTE J.; ESTEVAN, C.; ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology Letters*, 230, pp. 356-367. 2014.

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

SOUZA, A. M.; SALVIANO, A.M.; MELO, J.B.F.; FELIX, W.P.; BELÉM, C.S.; RAMOS, P.N. Estudo sazonal das concentrações de metais pesados em águas da bacia do submédio rio São Francisco, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*. [online]. 2016, v.76, n.4, pp.967-974. Epub May 06, 2016.

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

STOHS, S.J.; HAGCHI, D.; HASSOUN, E.; BAGSHI, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and oncology*. 19, 201-213. 2000.

STORER, T.I.; USINGER, R.L. *Zoologia Geral*. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 757p. 1979.

THÉRON, P.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; DAVIT-SPRAUL, A.; CONTI, M.; LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: An analytical approach. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 3, 373-384. 2000.

THIRUMAVALAVAN, R. Effect of copper on carbohydrate metabolism fresh water fish, *Catla catla*. *Asian Journal of Science and Technology*. 5, 95-99. 2010.

TOKATLI, C. Use of the potential ecological risk index for sediment quality assessment: A case study of Dam Lakes in the thrace part of the Marmara Region. *Aquatic Science and Engineering*. v. 34, n. 3, p. 90-95. doi: <https://doi.org/10.26650/ASE2019545919>. 2019.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M.. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, n. 2, p. 178–89, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v. 5, n. 4, p. 217-225, 1996.

VASAK, M.; HASLER, D.W. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*. v.4, p.177-183. 2000.

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

VERONEZ, A.C.S.; SALLA, R.V.; BARONI, V.D.; BARCAROLLI, I.F.; BIANCHINI, A.; DOS REIS MARTINEZ, C.B.; CHIPPARI-GOMES. 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, 2016.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CERATTO, N.; PANFOLI, I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*, v. 46, n. 2, p. 407-417, 2000.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar. Environmental Research*. 44 (1), 69-84. 1997.

VIDAL, F.A.P. Os efeitos do contaminante emergente lítio e da suplementação com selênio sobre a metamorfose de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*. Dissertação de Mestrado (PósGraduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, Sorocaba, 2019.

VIEIRA, M.I. Capítulo V, Algumas Características da Rã Touro. In: VIEIRA, M. I. Rã Touro Gigante. Características e Reprodução. 4a edição. São Paulo, p. 17-19. 1993.

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

WALKER, C.H.; SIBLY, R.M.; HOPKIN, S.P.; PEAKALL, D.B. Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition. Londres: Taylor & Francis Group. New York. 2012.

WELLS K.D. The ecology and behavior of amphibians. London: The University of Chicago, 2007.

WELLS, K.D. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, Chicago. 1148 p. 2007.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 200. IPCS International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Cadmium in Drinkingwater Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/80/Rev/1, 2011 Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2018.

WU, B.; WANG, G.; WU, J.; FU, Q.; LIU, C. Sources of Heavy Metals in Surface Sediments and an Ecological Risk Assessment from Two Adjacent Plateau Reservoirs. Sources of Heavy Metals in Surface Sediments and an Ecological Risk Assessment from Two Adjacent Plateau Reservoirs. PLOS ONE v. 9, n. 7, e102101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102101>. 2014.

YU, Y.; CUI, Y.; NIEDERNHOFER, L.J.; WANG, Y. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. Chemical Research in Toxicology, v. 29, n. 12, p. 2008-2039, 2016.

ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI E. (EE). Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. 2ed. Rima. p472. 2014.

ZAGATTO, P.A; BERTOLETTI, E. (Eds) Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. Rima, São Carlos, 478p. 2008.

ZAGREBIN, A.O.; RUMYANTSEV, V.A.; TONKOPII, V.D. Developing Methods for Bioidentification of Xenobiotics for Water Quality Assessment. Water Resources, 2016, Vol. 43, No. 1, pp. 141-144. 2016.

ZEBRAL, Y.D.; ROZA, M.; FONSECA, J.S.; COSTA, P.G.; OLIVEIRA, C.S.; ZOCKE, T.G. PIZZOLA, J.L.D., ROBALDO, R.B., BIANCHINI, A. Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. Aquatic Toxicology, 209, 142-149. 2019.

ANEXO 1

Pró Reitoria
de Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação ecotoxicológica da água do rio Sorocaba utilizando uma análise integrada de biomarcadores bioquímicos e morfológicos em girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw,1802).", protocolada sob o CEUA nº 2578040219 (ID 001135), sob a responsabilidade de **Cleoni dos Santos Carvalho** e equipe; *Lilian Franco Belussi*; *Marisa Narciso Fernandes*; *Heidi Samantha Moraes Utsunomiya* - 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 26/02/2019.

We certify that the proposal "Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba river using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw,1802).", utilizing 216 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 2578040219 (ID 001135), under the responsibility of **Cleoni dos Santos Carvalho** and team; *Lilian Franco Belussi*; *Marisa Narciso Fernandes*; *Heidi Samantha Moraes Utsunomiya* - 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 02/26/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **03/2021** Área: **Biologia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Anfíbios** sexo: **Machos e Fêmeas** Idade: **10 a 16 dias** N: **216**

Linhagem: ***Lithobates catesbeianus*** Peso: **2 a 4 g**

Local do experimento: Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LaBioM) e sala de coleções, Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba;

São Carlos, 27 de fevereiro de 2019

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

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