



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAQUEL RODRIGUES CASOTI

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NO BIVALVE *Anodontites trapesialis* SUBMETIDOS A TESTES IN SITU EM UM RIBEIRÃO ANTROPIZADO

Londrina – Paraná

2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RAQUEL RODRIGUES CASOTI

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NO BIVALVE
Anodontites trapesialis SUBMETIDOS A TESTES IN SITU
EM UM RIBEIRÃO ANTROPORIZADO**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina – Paraná

2024

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Claudia Bueno dos Reis Martinez

Prof(a). Dr(a). Juliana Delatim Simonato Rocha

Prof(a). Dr(a). Luciana Fernandes de Oliveira

Suplente: Prof(a). Dr(a). Mariana Machado Lauer

Londrina, 09 de maio de 2024

Dedico este trabalho ao meu avô Luiz, que permanece me motivando a ir além mesmo após sua partida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Claudia Bueno dos Reis Martinez, por todas as oportunidades e ensinamentos desde a minha entrada no laboratório. Obrigada por me apoiar durante a escolha deste projeto, me dando liberdade e ao mesmo tempo me instruindo durante sua elaboração. De fato, você é uma referência como professora, pesquisadora e mulher, obrigada por ser um exemplo que me inspira a seguir em frente com nossa profissão.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Prof^a Dr^a Juliana Delatim Simonato Rocha, Prof^a Dr^a Luciana Fernandes de Oliveira e Prof^a Dr^a Mariana Machado Lauer, por aceitaram o convite, contribuindo com a minha formação como pesquisadora e com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço em especial à Prof^a Dr^a Juliana Delatim Simonato Rocha, por ter me apresentado a ecotoxicologia e aberto as portas do Laboratório de Ecofisiologia Animal. Obrigada pelas conversas e pelo apoio de sempre.

Agradeço ao Willian por ter me acompanhado com tanta atenção e paciência durante esse trabalho, principalmente ao longo do último semestre. Obrigada por ser um ótimo professor, pelos conselhos, risadas e por toda a parceria!

Agradeço à Caroline Santos por todos os ensinamentos e auxílios, desde a minha primeira iniciação científica até aqui. Obrigada pela paciência e por ter instigado em mim tantas reflexões sobre o trabalho e a vida.

Agradeço a todos os companheiros que fiz no laboratório, Tiago, Carol Guerra, Letícia, Vanessa, Milena, Gabi, Jamille e Jéssica, por me ensinarem os primeiros passos na rotina de pesquisa, por me ajudarem com este trabalho e por todas as conversas.

Agradeço ao Wagner, por toda ajuda com as amostragens e com as análises.

Agradeço ao Robson, pelo auxílio com o transporte e exposição dos animais em campo, bem como agradeço ao professor Weliton, José Otávio, Milena Navarro e professora Diana.

Ainda, agradeço à professora Diana por analisar os contaminantes orgânicos nas amostras de água e ao professor Sérgio pelas análises de coliformes.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento que me permitiu me dedicar a esse trabalho.

Agradeço ao Djalma por me ajudar na construção das gaiolas com muito empenho.

Agradeço aos meus amigos vagalumes, Gabriela, João Caetano, Suéllen e Yasmin, por me acompanharem diariamente ao longo dos últimos cinco anos. Obrigada pela compreensão, pelas palavras de conforto nos meus momentos de caos e também, por tantas risadas e bons momentos.

Agradeço à Mari, à Raquel e ao Matheus, meus amigos queridos que estão comigo há tanto tempo, me apoiando, me ouvindo e torcendo por mim.

Não obstante, agradeço à minha família. Ao meu tio, Luiz, e às minhas tias, Márcia, Marli e Grazi, por todo o suporte dado para que eu me desenvolvesse nos estudos e na vida. Às minhas avós, Fúlvia e Maria Zilda, por cuidarem de mim com tanto carinho e disposição, e ao meu avô Luiz, pelos cuidados e por sempre me lembrar do valor do estudo. À minha prima Maria Eduarda, pela parceria e amizade desde sempre.

Agradeço ao meu pai, Marco, e à minha mãe, Meire, por não medirem esforços para que eu tivesse todas as oportunidades possíveis, por me amarem e por serem exemplos de profissionais em suas áreas. Também agradeço à minha irmã, Polliana, por ter cuidado de mim e me ensinado tanto sobre a vida, por me mostrar que é possível recomeçar quando sentimos que ainda não encontramos o melhor para nós. Amo vocês e espero conseguir retribuir tudo que fazem por mim.

Agradeço ao meu parceiro de vida, Fernando, por me apresentar o que é tranquilidade, por me incentivar e por cuidar de mim com tanto amor. Obrigada por sempre me lembrar que as coisas dão certo no final. Amo você e amo a família que estamos construindo, com a Bizonha, a Bizinha e a Lilo.

Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Esse trabalho também é de vocês, porque nada se conquista sozinho.

CASOTI, Raquel Rodrigues. AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NO BIVALVE *Anodontites trapesialis* SUBMETIDOS A TESTES IN SITU EM UM RIBEIRÃO ANTROPIZADO. 2024. 53 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O Ribeirão Água das Araras – Cornélio Procópio/Santa Mariana, Paraná, Brasil, é uma fonte água para o abastecimento público. Apesar de sua importância, ao longo de seu percurso são observadas possíveis fontes de contaminação aquática, tais como a aplicação de agrotóxicos na agricultura, estações de tratamento de água próximas (ETA) e efluentes de estações de esgoto (ETE). Assim, este estudo avaliou biomarcadores em indivíduos do bivalve neotropical *Anodontites trapesialis* expostos a três locais deste ribeirão. Os espécimes foram coletados em um pesqueiro e divididos em cinco grupos amostrais (n = 8/grupo). O primeiro grupo foi amostrado no dia da coleta para a determinação dos parâmetros biológicos basais (TOCA). O segundo grupo foi exposto por sete dias apenas à água desclorada (CTR). Já os demais grupos foram confinados em gaiolas por uma semana nos seguintes locais: represa de uma propriedade agrícola (PA); corpo d'água anterior à uma estação e captação de água (PB); corpo d'água a jusante de uma ETE (PC). Após as exposições, os tecidos dos animais foram coletados para análises de biomarcadores de estresse oxidativo, concentração de glicose e concentrações iônicas. Observou-se variações nas defesas antioxidantes e diminuição nos danos oxidativos em PA, PB e PC quando comparados ao CTR, além de desvios na concentração iônica em todos os grupos em comparação ao CTR. Portanto, estes resultados podem sugerir a presença de contaminantes nos locais avaliados que levem a alterações na defesa antioxidante e no transporte iônico da espécie estudada.

Palavras-chave: biomarcadores; agrotóxicos; ecotoxicologia.

CASOTI, Raquel Rodrigues. **Assessment of biomarkers on the bivalve *Anodontites trapesialis* exposed to an anthropized river**. 2024. 53 pp. Undergraduate thesis (Bachelor in Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

The Água das Araras Stream – Cornélio Procópio/Santa Mariana, Paraná, Brazil, is a source of water for public supply. Despite its importance, potential sources of aquatic contamination are observed along its course, such as the application of pesticides in agriculture, nearby wastewater treatment plants (WWTP), and effluents from sewage treatment plants (STP). Thus, this study evaluated biomarkers in individuals of the neotropical bivalve *Anodontites trapesialis* exposed to three locations in this stream. Specimens were collected at a fishing site and divided into five sample groups (n = 8/group). The first group was sampled on the day of collection to determine baseline biological parameters (TOCA). The second group was exposed for seven days only to dechlorinated water (CTR). The remaining groups were confined in cages for one week at the following locations: a dam on an agricultural property (PA); the water body upstream of a water treatment and intake station (PB); the water body downstream of an STP (PC). After the exposures, the tissues of the animals were collected for analysis of oxidative stress biomarkers, glucose concentration, and ionic concentrations. Variations in antioxidant defenses and a decrease in oxidative damage were observed in PA, PB, and PC compared to CTR, as well as deviations in ionic concentration in all groups compared to CTR. Therefore, these results may suggest the presence of contaminants in the evaluated locations leading to changes in antioxidant defense and ionic transport.

KEY-WORDS: biomarkers; pesticides; ecotoxicology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	HIPÓTESES	14
4	REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1	Ecotoxicologia	15
4.2	Contaminação dos ecossistemas aquáticos	17
4.3	Diagnóstico e biomonitoramento do ambiente aquático.....	19
4.4	Biomarcadores	20
4.5	Modelos biológicos	23
4.6	<i>Anodontites trapesialis</i>	24
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	Área de estudo	28
5.2	Delineamento experimental	30
5.3	Amostragem	33
5.4	Análises dos biomarcadores.....	34
5.4.1	Estresse oxidativo	34
5.4.2	Concentração de glicose	35
5.4.3	Concentração de íons	36
5.4.4	Análise estatística	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Parâmetros da água	37
6.2	Biomarcadores	38
6.2.1	Estresse oxidativo	38

6.2.2	Concentração de glicose	39
6.2.3	Concentração de íons	39
7	DISCUSSÃO.....	41
8	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho buscou avaliar biomarcadores de indivíduos da espécie *Anodontites trapesialis* (LAMARCK, 1819) expostos em diferentes pontos do Ribeirão Água das Araras (Cornélio Procópio e Santa Mariana, Paraná, Brasil) como parte de uma investigação da contaminação aquática deste corpo d'água, influenciado por atividades antrópicas ao longo de sua extensão.

Localizado na região norte do estado do Paraná - Brasil, o Ribeirão Água das Araras é um manancial que nasce no município de Cornélio Procópio e flui para a cidade vizinha, Santa Mariana. Esse corpo d'água se destaca por ser a principal fonte de abastecimento público de água de Santa Mariana e pela presença de área de conservação de mata atlântica na porção superior do ribeirão, contudo seu percurso é marcado por influências humanas variadas desde sua nascente até as proximidades de sua foz. Dentre os componentes desse cenário, chamam atenção a nascente do ribeirão situada em uma propriedade agrícola, uma estação de captação de água à jusante da área conservada e próxima a uma estação de tratamento de água (ETA) e, por fim, uma estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade de Santa Mariana (GALINDO *et al.*, 2023; PARANÁ, 2016).

No Brasil, a Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) determina parâmetros para classificar os corpos d'água e realizar o gerenciamento ecológico dos mesmos (BRASIL, 2015). A contaminação de ambientes aquáticos é uma problemática recorrente na atualidade pois, seja por acidente ou de forma intencional, uma variedade de agentes químicos é incorporada aos corpos d'água através de diferentes (CARRIQUIRIBORDE, 2021). Dentre as causas da poluição da água doce, o escoamento de produtos aplicados na lavoura e os efluentes de estações de tratamento de águas residuais estão dentre as fontes mais relevantes (NIKINMAA, 2014).

Em ambientes rurais, os agrotóxicos são conduzidos até os corpos de água doce pela lixiviação e pelo escoamento, independentemente do método de aplicação do composto. Essa via de contaminação é uma das mais relevantes e, no Brasil, 59% dos agrotóxicos presentes em ambientes dulcícolas já apresentaram risco à biota (ALBUQUERQUE *et al.* 2016; MIGLIORANZA, 2021; NIKINMAA, 2014). Ainda assim, a principal fonte de contaminação aquática são as águas residuais, sejam

domésticas ou industriais, amplificadas pelos avanços da urbanização (ENNS *et al.* 2023; NIKINMAA, 2014). Embora 52,8% das águas residuais sejam tratadas, muitas ETAs não possuem sistemas que removam completamente os contaminantes. Ademais, tanto as ETAs como as ETEs produzem um rejeito oriundo do processo de tratamento, portanto seus efluentes lançam nos corpos d'água compostos orgânicos e inorgânicos no geral, tais como metais, fármacos, cosméticos e agrotóxicos, além de microrganismos patogênicos no caso das ETE (CAREY; MIGLIACCIO, 2009; JONES *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2024).

Tendo em vista essas questões, os estudos ecotoxicológicos procuram investigar a emissão e o destino dos contaminantes nos ecossistemas, bem como os efeitos deletérios que eles podem causar na biota (CARRIQUIRIBORDE, 2021). Para tanto é possível utilizar biomonitores, organismos sensíveis à contaminação que sofrem alterações em suas respostas biológicas quando expostos a tóxicos. Essas alterações, intituladas biomarcadores, são desvios no estado normal do organismo observados em diferentes níveis de hierarquia biológica, podendo indicar exposição a contaminantes ou os efeitos dos mesmos (VAN DER OOST *et al.*, 2005). Em estudos de campo, também chamados de *in situ*, o biomonitor pode ser levado até o local de interesse onde será exposto, sendo utilizado para averiguar alterações no ecossistema e na qualidade da água (BERTHET, 2015; RAND; WELLS; MCCARTY, *et al.* 1995).

O mexilhão dulcícola neotropical *A. trapesialis* é considerado um biomonitor adequado por ser um organismo amplamente distribuído e abundante na região neotropical, incluindo o Brasil. São vários os biomarcadores que podem ser analisados nos animais da espécie, como por exemplo alterações devido ao estresse oxidativo ou no metabolismo energético (OLIVEIRA, 2016; CUEZZO *et al.*, 2020). Esse modelo biológico já foi utilizado em estudos *in situ* (OLIVEIRA, *et al.*, 2016), porém ainda são poucos os trabalhos que o usam para acessar a contaminação de um ambiente natural.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar biomarcadores em exemplares de *A. trapesialis* submetidos a testes *in situ* em um ribeirão sujeito a diferentes tipos contaminação.

2.2 Objetivos específicos

Utilizando tecidos de *A. trapesialis* confinados em diferentes locais do Ribeirão Águas das Araras, pretende-se:

- averiguar a presença de compostos pró e antioxidantes por meio da análise de biomarcadores de estresse oxidativo;
- analisar variações nas concentrações de glicose possivelmente causadas por contaminantes;
- verificar a ocorrência de desvios nas concentrações iônicas, que podem ser causadas por metais.

3 HIPÓTESES

Dadas as circunstâncias em que se encontram os locais de estudo no ribeirão, as hipóteses estabelecidas foram:

- Os animais expostos ao ribeirão antropizado apresentarão alterações nos biomarcadores.
- A mistura de contaminantes presente no rejeito de esgoto levarão a variações em mais biomarcadores nos animais expostos à jusante da ETE.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Ecotoxicologia

O termo “ecotoxicologia” foi cunhado em 1969 pelo francês René Truhaut, durante o Conselho Internacional das Uniões Científicas realizado em Estocolmo. A definição trazida pelo cientista no momento considerava a ecotoxicologia uma área da toxicologia focada nos efeitos dos contaminantes sobre os componentes bióticos do ecossistema. Entretanto, sob esta perspectiva, havia a isenção do ser humano sobre esses efeitos, não sendo incluídas consequências de suas ações, tais como o desmatamento, a exploração exacerbada de recursos e a introdução de espécies exóticas. Assim, da década de 1970 em diante, as definições seguiram sendo refinadas (CARRIQUIRRIBORDE, 2021).

Atualmente a ecotoxicologia pode ser vista como a ciência que estuda a distribuição, o destino e os efeitos adversos diretos e indiretos dos contaminantes sobre a estrutura e função dos constituintes da biosfera, buscando elaborar soluções e utilizar ferramentas para prevenir, atenuar e remediar estes efeitos (CARRIQUIRRIBORDE, 2021; NEWMAN; CLEMENTS, 2008; OLIVEIRA, 2012). Para atingir o que propõe, a ecotoxicologia abrange conhecimentos das ciências biológicas, exatas e da terra, e é, portanto, uma ciência multidisciplinar (CARRIQUIRRIBORDE, 2021; OLIVEIRA, 2012).

Entende-se como contaminante qualquer agente de origem física, química (natural ou sintética) ou biológica que se encontre em níveis anormais no ambiente devido à atividade antrópica, podendo este apresentar algum malefício ao ecossistema. Quando há evidências de seus efeitos danosos, o contaminante passa a ser considerado também um poluente (CARRIQUIRRIBORDE, 2021; OLIVEIRA, 2012).

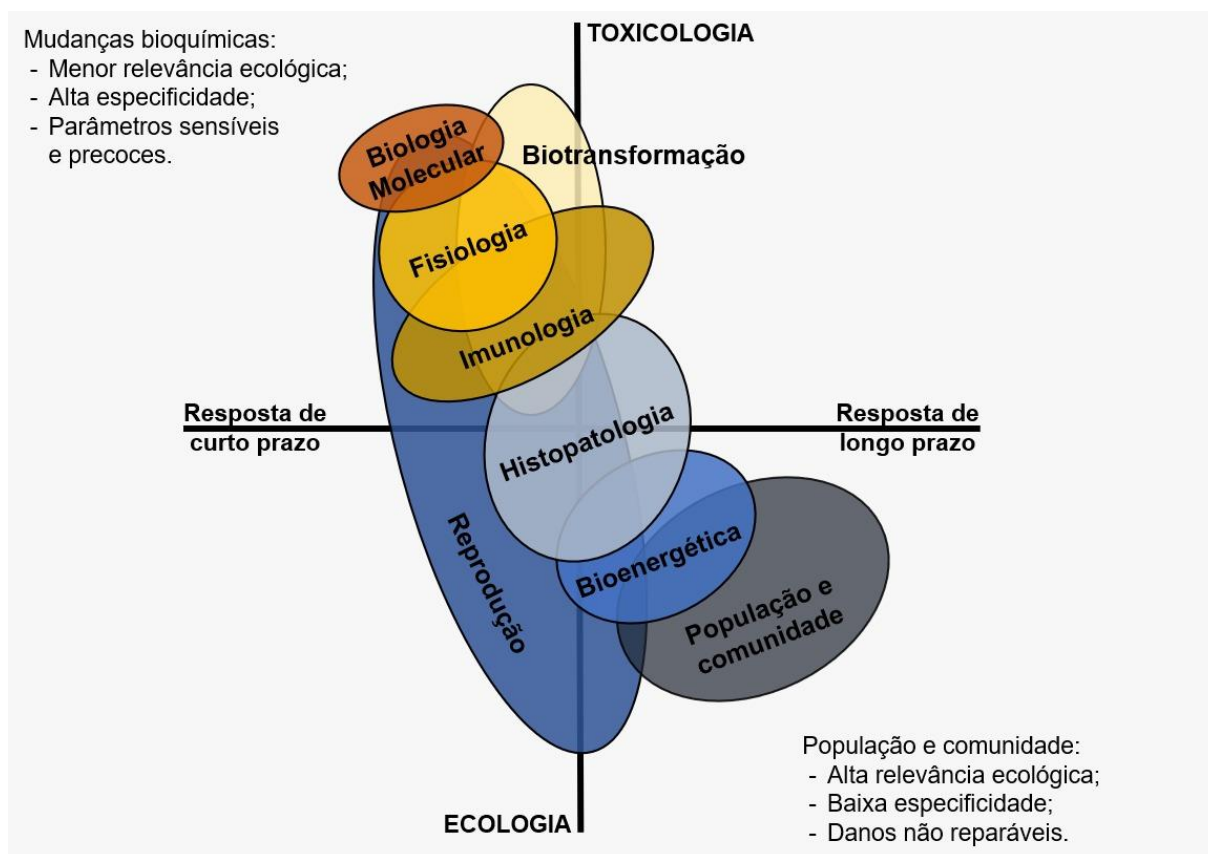
Os efeitos adversos causados por tais agentes podem ocorrer em diferentes níveis hierárquicos e serem percebidos em escalas biológicas distintas. Tais consequências podem ser classificadas como:

- a) letais: se apresentam como mudanças no índice de mortalidade de uma população;
- b) subletais: aparecem em escalas biológicas de menor hierarquia, desde o nível molecular até alterações no

comportamento do indivíduo (CARRIQUIRRIBORDE, 2021; OLIVEIRA, 2012).

Respostas em níveis menores de organização biológica tendem a ocorrer mais rapidamente, portanto podem ser percebidas em curtos intervalos de tempo, ao contrário de mudanças em níveis populacionais, de comunidade ou ecossistemas, que demandam períodos maiores para se estabelecerem (Figura 1). Utilizar parâmetros biológicos em níveis hierárquicos menores permite reconhecer antecipadamente a qualidade e presença de contaminantes no ecossistema aquático, além de estabelecer relações mais precisas de causa e efeito. Tais características tornam este tipo de análise eficaz, especialmente para trabalhos de curta duração (CARRIQUIRRIBORDE, 2021).

Figura 1 – Relação entre tempo de exposição e níveis de respostas biológicas.



Fonte: Santos (2020), traduzido e adaptado de Amiard-Triquet; Amiard; Mouneyrac (2015).

Os contaminantes podem ter origem natural ou artificial, sendo produzidos por fontes pontuais ou difusas. As fontes pontuais lançam os contaminantes no ecossistema a partir de emissões discerníveis (ex. chaminés,

efluentes de ETA e ETE, ...), enquanto as fontes difusas os liberam de forma ampla (ex. pulverização, escapamentos de automóveis, ...) . Quando alcançam o ambiente, os compostos químicos podem ser transportados, dispersos e até mesmo sofrer reações até que entrem em contato com os seres vivos, seja em meio ambiente terrestre, aéreo e aquático. Entretanto, é preciso ressaltar que os ecossistemas aquáticos são os receptores finais de muitas fontes de contaminação, pois o que é lançado no ar ou no solo pode chegar aos rios, lagos e mares através de processos como a precipitação, a lixiviação, a cadeia alimentar e outros (MIGLIORANZA, 2021).

4.2 Contaminação dos ecossistemas aquáticos

Historicamente o crescimento populacional, a urbanização e o desenvolvimento industrial tem sido diretamente proporcionais aos impactos antropogênicos sobre o ambiente aquático (NIKINMAA, 2014; SILVA *et al.*, 2023). A contaminação pode ocorrer deliberadamente ou ser acidental e, por mais que solucionar questões existentes seja possível, remediar e prevenir problemas futuros exige um comprometimento financeiro raramente adotado pela indústria (NIKINMAA, 2014).

Acredita-se que o primeiro grande impacto no ecossistema aquático tenha sido causado pelo uso de encanamentos de chumbo nas grandes cidades romanas. Posteriormente, a construção de sistemas de esgoto e a utilização de banheiros também se tornou um problema. Ainda hoje águas residuais de origem doméstica e industrial permanecem sendo a maior fonte de contaminação aquática (NIKINMAA, 2014). Os rejeitos das estações de tratamento de água e esgoto chamam atenção pelo risco potencial relacionado à presença de compostos tóxicos e microrganismos patogênicos em sua composição (SOUZA *et al.*, 2024).

As ETA integram os avanços da urbanização, tendo sido estabelecidas justamente para remover contaminantes presentes nas águas residuais que adentram o ambiente (ENNS *et al.*, 2023). Atualmente, cerca de 52,8% das águas residuais no mundo passam pelo tratamento (JONES *et al.*, 2021). Contudo, são poucas as estações que apresentam sistemas capazes de retirar completamente os contaminantes da água. Assim, compostos orgânicos e inorgânicos em geral, tais como cosméticos, metais e fármacos, costumam compor o rejeito das ETA e ser

lançados em corpos d'água juntamente com os efluentes das estações (CAREY; MIGLIACCIO, 2009; SOUZA *et al.*, 2024).

O tratamento dos resíduos sanitários também é necessário para a preservação dos recursos de água, assim as ETE atuam na redução dos os contaminantes orgânicos e inorgânicos contaminação microbiológica. Porém, a atividade microbiana e a sedimentação da matéria que ocorrem durante as etapas do tratamento resultam na produção de um rejeito de esgoto. Esse rejeito pode ter em sua composição macro e micronutrientes, microrganismos patogênicos e metais, substâncias que podem apresentar riscos à biota aquática, tais como citotoxicidade, indução de danos histológicos e alterações na taxa reprodutiva (SOUZA *et al.*, 2024).

Em zonas rurais, a lixiviação e o escoamento superficial carregam agrotóxicos e fertilizantes até ambientes dulcícolas que estão próximos aos campos, independentemente da forma com que são aplicados (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; NIKINMAA, 2014; MIGLIORANZA, 2021). A lixiviação dos contaminantes agrícolas sofre interferência da precipitação, pois o volume de contaminantes que alcançará os corpos d'água é proporcional à quantidade de chuva ao longo da aplicação desses. Tais fatores fazem dessa fonte de contaminação uma das mais relevante e, no Brasil, cerca de 59% dos agrotóxicos que identificados em água doce já indicaram risco à biota, enquanto compostos fertilizantes podem levar à eutrofização (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; NIKINMAA, 2014).

Somado a isso, fora dos centros urbanos muitas vezes a infraestrutura é precária, podendo ser observada na frequente ausência dos sistemas de tratamento de esgoto, da coleta de lixo e das vias não pavimentadas que atuam como fontes de sedimentos. Embora sejam essenciais para o funcionamento de ecossistemas aquáticos, sedimentos são também um repositório de contaminantes dispensados nos corpos d'água (FERNANDES *et al.*, 2018).

Apenas 3% das reservas de água do planeta são dulcícolas e cerca de 12% da água doce superficial se encontra no Brasil. Em território brasileiro a proteção dos ambientes de água doce, estuarina e marinha contra a poluição é fundada na Resolução nº 20/1986, elaborada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 1986). Junto a ela, a Resolução nº 357/2005 estabelece critérios para a classificação e gerenciamento ecológico de corpos d'água e a Resolução nº 430/2011 determina padrões para os efluentes de ETA e indústrias (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

4.3 Diagnóstico e biomonitoramento do ambiente aquático

O monitoramento ambiental é realizado a partir de avaliações de variáveis biológicas, químicas e físicas ao longo do tempo, seguindo metodologias que possam ser comparadas. Seu objetivo é a coleta de dados para determinar a qualidade do ambiente (RAND; WELLS; MCCARTY, *et al.* 1995).

O monitoramento químico busca identificar contaminantes em diferentes componentes do ecossistema (águas doce, salgada e subterrânea, efluentes; sedimentos e lixiviados; tecidos e fluidos biológicos). Essa abordagem visa demonstrar a distribuição espacial dos contaminantes e analisar tendências na concentração dos mesmos ao longo do tempo, procurando identificar os locais contaminados e se o perfil de contaminação tem piorado ou melhorado. Para tanto, são estabelecidos padrões de qualidade ambiental (PQA), concentrações que não podem ser ultrapassadas na água, sedimento e biota. Quando um PQA é excedido medidas de gerenciamento do ambiente devem ser tomadas, tais como a procura por possíveis fontes de contaminação ou o manejo de efluentes dos quais já se tem ciência (AMIARD-TRIQUET, 2015).

Muitas vezes apenas a análise química da água não é considerada uma matriz válida para realizar um diagnóstico, pois concentrações baixas de micropoluentes são difíceis de detectar e há chances de contaminações secundárias com o manuseio das amostras. Ainda assim ela é uma das primeiras escolhas para monitorar contaminantes específicos que se distribuem fortemente em meio aquático, mas não são facilmente identificáveis em sedimentos ou na biota. Já o sedimento representa o principal repositório dos contaminantes e misturas presentes no ambiente aquático, contendo registros de contaminações passadas em seus diferentes estratos. De forma parecida, os organismos também integram misturas presentes na água em seus tecidos que, ao serem analisados, demonstram também quais contaminantes apresentam maior significância biológica (AMIARD; AMIARD-TRIQUET, 2015; FERNANDES *et al.*, 2018).

Além das análises químicas, a abordagem central na toxicologia aquática é o biomonitoramento, isto é, o uso sistemático de organismos vivos para a avaliação de alterações no ecossistema ou na qualidade da água causadas pela contaminação

(NIKINMA, 2014; RAND; WELLS; MCCARTY, *et al.* 1995). É possível estudar indivíduos, espécies, populações e comunidades para compreender as mudanças que podem ocorrer e os organismos empregados podem ser bioindicadores ou biomonitores. Bioindicadores demonstram as mudanças em um ecossistema por meio de sua presença, ausência e abundância relativa súbita ou gradual (RAND; WELLS; MCCARTY, *et al.* 1995). Por sua vez organismos biomonitores respondem à presença de contaminantes com alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas que podem ser observadas em sua taxa de crescimento, capacidade reprodutiva e modificações no comportamento. Essas alterações são também chamadas de biomarcadores, utilizados para indicar a exposição e demonstrar o efeito de contaminantes (BERTHET, 2015; RAND; WELLS; MCCARTY, *et al.* 1995).

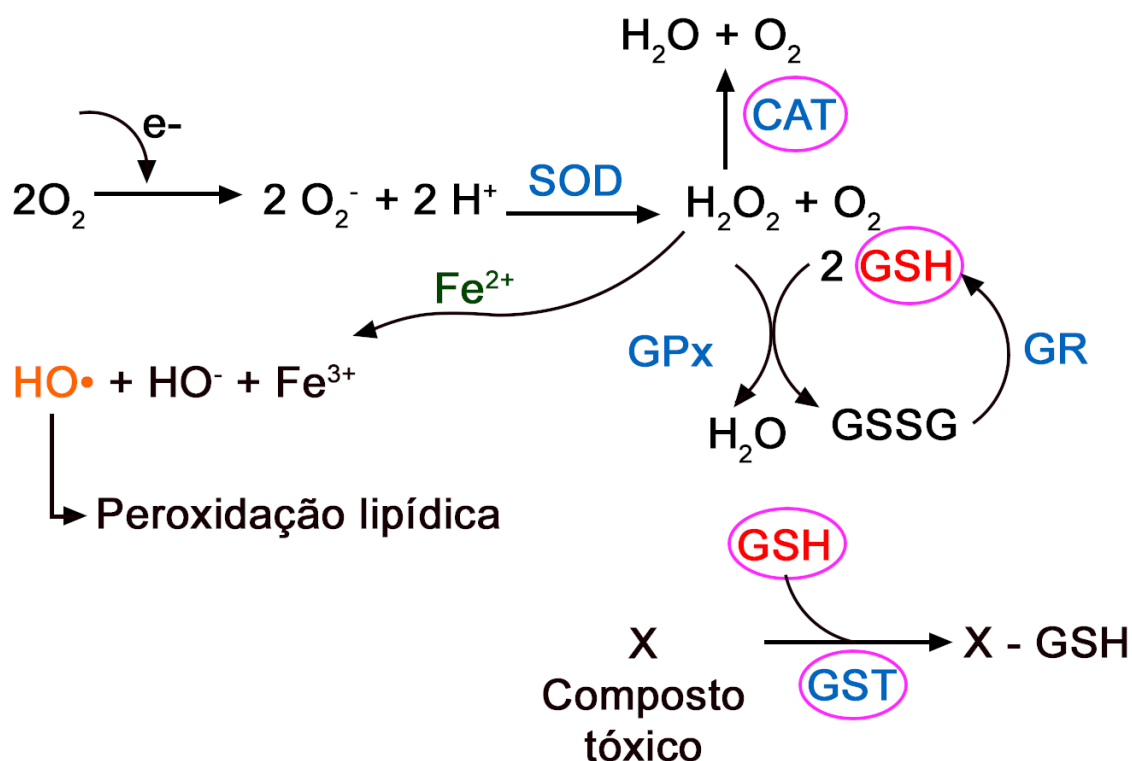
Ainda, o biomonitoramento pode ser realizado por meio de testes *in situ*, que são realizados em áreas de interesse (RAND *et al.*, 1995). Esses estudos podem ocorrer com a coleta de organismos no local de estudo (biomonitoramento passivo) ou com a aquisição de indivíduos de aquiculturas ou populações naturais que serão posteriormente expostos à área de interesse dentro de gaiolas (biomonitoramento ativo) (AMIARD-TRIQUET, 2015). Quando comparados aos testes de toxicidade em laboratório, os estudos *in situ* garantem uma exposição mais realista dos indivíduos ao cenário de contaminação. Por exemplo, os efeitos de muitos químicos são atenuados no campo devido à redução de sua persistência e biodisponibilidade, ao mesmo tempo que existem compostos que tem sua toxicidade acentuada pelas condições físico químicas do campo (RAND *et al.*, 1995).

4.4 Biomarcadores

Biomarcadores são alterações em respostas biológicas que podem estar relacionadas à exposição aos contaminantes ambientais e seus efeitos tóxicos e que podem ser detectadas desde a escala molecular até a comportamental. Assim, representam quaisquer desvios do estado normal que não são observados em um organismo íntegro. O estresse causado por um contaminante muitas vezes engatilha uma cascata de reações e, teoricamente, cada uma delas pode atuar como biomarcador (VAN DER OOST *et al.*, 2005).

Vários contaminantes podem levar ao estresse oxidativo, isto é, um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a ação de defesas antioxidantes (Figura 2). As ERO podem ser um produto normal do metabolismo de alguns organismos, contudo são capazes de causar efeitos deletérios devido a sua citotoxicidade. Um exemplo desses efeitos é a peroxidação lipídica (LPO), que pode ser verificada pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e apontar a ocorrência de danos oxidativos (CAZENAVE; AMÉ; MENONE, 2021; CHAHOURI *et al.*, 2023; NIKINMAA, 2014; VAN DER OOST *et al.*, 2005).

Figura 2 - Atividade de moléculas que atuam na defesa antioxidante e na biotransformação. Estão destacadas em azul as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e a enzima de biotransformação glutatona-S-transferase (GST). Em vermelho está destacada a molécula antioxidante não enzimática GSH e o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), espécie mais reativa de oxigênio, está representada em laranja. Estão circuladas em rosa as moléculas citadas no texto.



Fonte: Modificado de Monserrat, 2021.

As defesas antioxidantes são compostos capazes de atrasar, prevenir ou até mesmo inibir a formação de radicais livres (NIKINMAA, 2014; VAN DER OOST *et al.*, 2005). Dentre elas, a catalase (CAT) é uma hemoproteína presentes nos peroxissomos responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular ($\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). A CAT é uma das primeiras defesas antioxidantes a ser induzida e, assim como o observado em outras enzimas, sua atividade é diretamente proporcional à quantidade de substrato (NEWTON; COPE, 2007; NIKINMAA, 2014; VAN DER OOST *et al.*, 2005).

Além de enzimas, em meio a esses mecanismos de proteção atuam os antioxidantes não-enzimáticos, sendo o principal deles a glutathione (GSH). A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular que desempenha funções no equilíbrio redox atuando como cofator enzimático na conjugação de metabólitos tóxicos (endógenos ou exógenos). Seu potencial como biomarcador é também reforçado por sua presença na maioria das células (MONSERRAT, 2021; NIKINMAA, 2014).

Quando estão em ambiente contaminado, os organismos podem excretar os contaminantes absorvidos no mesmo formato com que tiveram contato ou biotransformá-los. A biotransformação consiste na metabolização de um composto orgânico original formando um correspondente mais hidrofílico e facilmente excretável (CAZENAVE; AMÉ; MENONE, 2021; CHAHOURI *et al.* 2023; VAN DER OOST *et al.*, 2005). A sequência desse metabolismo se dá em três fases que podem ser caracterizadas pelo tipo de reação que englobam. Durante a fase I ocorrem as reações de oxidação, redução ou hidrólise do contaminante. O produto dessas reações pode ser conjugado a uma molécula endógena durante a fase II. Também é possível que um contaminante orgânico não passe pela fase I, se ligando prontamente à molécula antioxidante quando obtido pelo organismo. O encadeamento de reações tem fim na fase III, em que ocorre a eliminação dos produtos das reações da fase I e II (CAZENAVE; AMÉ; MENONE, 2021; VAN DER OOST *et al.*, 2005).

Dentre as enzimas envolvidas na biotransformação de contaminantes exógenos orgânicos, podem ser citadas as glutathione-S-transferases (GSTs). Operantes na fase II, as GSTs são um grupo de cinco enzimas que catalisam a conjugação de um contaminante ou seu metabólito a um ligante endógeno, tal como a GSH, aumentando o potencial de excreção dos mesmos (VAN DER OOST *et al.*, 2005). As GSTs são amplamente avaliadas como biomarcadores, incluindo no biomonitoramento com bivalves (OLIVEIRA, 2016). Por mais que apresentem

limitações em reconhecer quais são os causadores das respostas, suas oscilações podem ser provocadas por uma ampla variedade de compostos químicos, sendo aptas a identificar exposições em diferentes níveis de contaminação (CAZENAVE; AMÉ; MENONE, 2021).

Biomarcadores energéticos também são indicadores adequados para compreender o nível de poluição ambiental (CHAHOURI *et al.*, 2023). As concentrações de glicose podem ser responsivas a determinados poluentes, bem como as reservas energéticas são passíveis de alterações frente a uma exposição (CHAHOURI *et al.*, 2023; VAN DER OOST *et al.*, 2005). Dentre elas, em bivalves o glicogênio muscular se mostra sensível ao estresse ambiental (CHAHOURI *et al.*, 2023; HAAG *et al.* 1993 *apud* DUNN, FARRIS e HASSEL, 2006).

Alguns químicos, tais como metais e agrotóxicos, podem ainda interferir na permeabilidade de membranas, tanto em sua fase lipídica quanto em suas proteínas (NIKINMAA, 2014). As principais vias de transporte ativos de íons são a bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ ATPase), que mantém o gradiente de sódio e potássio através da membrana celular, e a bomba de cálcio (Ca^{2+} ATPase), responsável por manter as concentrações intracelulares de cálcio baixas. A inibição destas bombas pode levar a distúrbios em fenômenos que dependem da manutenção do gradiente iônico, como por exemplo a propagação do impulso nervoso (NIKINMAA, 2014). Assim, as concentrações de sódio, potássio, cálcio e outros íons, como o cloreto, são biomarcadores efetivos, tendo sua eficácia sido demonstrada também em bivalves de água doce (NEWTON; COPE, 2007).

4.5 Modelos biológicos

Modelos biológicos, ou espécies de referência, são os termos utilizados para se referir às espécies empregadas em estudos ecotoxicológicos. Estas espécies podem ser utilizadas em bioensaios de laboratório ou para o biomonitoramento. Para ensaios biológicos é comum o uso de grupos de organismos adquiridos de matrizes internas ou comerciais, enquanto para o biomonitoramento se utiliza de espécies sentinelas coletadas no local de estudo ou levadas até ele em gaiolas (BERTHET, 2015).

Em testes de laboratório é dada a preferência para espécies sejam fáceis de coletar ou reproduzir fora do local de origem. Dentre os modelos biológicos mais utilizados para ensaios laboratoriais se encontram alguns grupos de microrganismos, invertebrados e peixes. Existem protocolos de cultura bem estabelecidos para algas verdes (ex. *Raphidocelis subcapitata*), diatomáceas (ex. *Skeletonema costatum*) e cianobactérias (*Anabaena flos-aquae*). Geralmente o *endpoint* testado em microrganismos é a inibição do crescimento da espécie. Para pesquisas de curto e longo prazo, a *Daphnia magna* e outras espécies de dáfnias são muito utilizadas, bem como as espécies *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Danio rerio*, presentes em 10% dos estudos toxicológicos com peixes. Por sua vez, em testes que buscam avaliar a toxicidade de sedimentos a espécie de anfípoda *Corophium volutator* é a mais recorrente (BERTHET, 2015).

A respeito do biomonitoramento são utilizadas as chamadas espécies sentinelas. Sua utilização permite a identificação precoce da presença e biodisponibilidade de contaminantes em um ambiente, bem como as mudanças que podem ser causadas por eles em diferentes níveis de escala biológica, levando alterações no estado de saúde e no comportamento dos animais. As espécies sentinelas são adequadas para o biomonitoramento por apresentarem atributos como fácil identificação, natureza sedentária, ampla distribuição, fácil coleta sensibilidade a contaminantes, dentre outros (BERTHET, 2015; BOENING, 1997). Tanto em ambientes dulcícolas quanto marinhos, peixes e bivalves representam os dois maiores grupos de animais utilizados no biomonitoramento e, como não há uma única espécie sentinela ideal, abordagens utilizando múltiplas espécies são relevantes (BERTHET, 2015).

4.6 *Anodontites trapesialis*

O uso de bivalves para o biomonitoramento se iniciou na década de 1970 com a aplicação de indivíduos *Mytilus spp.* por Young, Heesen e Mcdermott (1976), a fim de analisar a contaminação por hidrocarbonetos clorados em ambientes costeiros e entremarés. A partir de então, bivalves passaram a ser considerados sentinelas do ecossistema aquático, biomonitores importantes por serem filtradores bentônicos, possuírem resiliência a variações ambientais e capacidade de

bioacumulação. Essas características permitem que eles detectem impactos ambientais e a poluição química antes de se tornarem irreversíveis no ecossistema (CHAHOURI *et al.*, 2023; HELMHOLZ *et al.*, 2016). Entretanto, ainda é necessário explorar o uso de bivalves neotropicais de água-doce, já que poucos representantes desses animais são aplicados na ecotoxicologia.

Dentre eles, o mexilhão neotropical *Anodontites trapesialis* (LAMARCK, 1819) (ordem Unionidae, família Mycetopodidae) é considerado um modelo biológico apropriado devido à sua abundância e ampla distribuição, que se inicia no México e segue ao sul até a Argentina por quase todos os países continentais da América Latina, incluindo o território brasileiro (Figuras 3 e 4) (CUEZZO *et al.*, 2020). Indivíduos pertencentes a essa ordem são popularmente chamados de ostras-de-rio ou mariscos-de-rio no português brasileiro, também recebem o nome popular de “prato” ou “saboneteira” no Brasil (AVELAR; VIANNA, 2008 *apud* AMARAL *et al.*, 2008).

Figura 3 - Exemplar da espécie *A. trapesialis*.



Fonte: a própria autora.

Animais do táxon *Unionidae* se destacam por serem moluscos que não possuem parentes marinhos recentes. Muitas vezes classificar espécies dentro do gênero *Anodontites* tem se mostrado uma tarefa desafiadora devido aos critérios estabelecidos. Ainda assim *A. trapesialis* é um táxon reconhecido e que atualmente não consta Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, não havendo empecilhos na sua utilização como modelo biológico (Instituto Chico Mendes de

Conservação da Biodiversidade, 2018). Existem variações morfológicas entre as populações, mas os indivíduos da região norte do Paraná podem ser identificados pela borda da concha no formato trapezoide e coloração escuro esverdeada (CUEZZO *et al.*, 2020).

Quando adultos costumam ser grandes em comparação a outras espécies do mesmo gênero, o que os torna modelos biológicos favoráveis pela abundância de tecidos e fácil coleta (CUEZZO *et al.*, 2020; HASSEL; FARRIS, 2006). Animais dessa espécie são sedentários, sendo encontrados no substrato de corpos d'água onde filtram material em suspensão para se alimentarem (WATTERS, 2006). Assim, utilizá-los para o monitoramento aquático é favorável devido a sensibilidade que podem apresentar aos contaminantes biodisponíveis tanto no grande volume de água que filtram quanto no sedimento em que se enterram (HASSEL; FARRIS, 2006). Vale ressaltar que são diversos os biomarcadores que podem ser estudados em indivíduos desta espécie e do grupo a que ela pertence, tais como enzimas de resposta ao estresse oxidativo, processos fisiológicos e biomarcadores de neurotoxicidade. A espécie já foi utilizada anteriormente em estudos tanto *in situ* quanto *in vivo* (OLIVEIRA, 2016; TESSER, 2022), mas ainda há poucos estudos que avaliam a contaminação do ambiente aquático utilizando-o.

Figura 4 - Mapa de distribuição da espécie *A. trapesialis* na região neotropical.



Fonte: The Mussel Project website.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de estudo

Quatro pontos da região Norte do Paraná foram avaliados quanto a contaminação ambiental. O Pesqueiro Toca do Jacaré – Londrina, PR foi determinado como ponto basal (TOCA) (Figura 5), local de onde foram coletados os animais de um tanque de pesca. Os outros pontos foram estabelecidos ao longo do Ribeirão Água das Araras, corpo d'água pertencente à bacia hidrográfica do Rio das Cinzas localizado Cornélio Procópio e Santa Mariana, PR (Figura 6A).

Figura 5 - Tanque do Pesqueiro Toca do Jacaré, Londrina, Paraná, Brasil, em que foi realizada a coleta dos animais.



Fonte: a própria autora.

O Ribeirão Água das Araras é um manancial que nasce em Cornélio Procópio e flui para o município de Santa Mariana, onde atua como fonte de abastecimento público (GALINDO *et al.*, 2023; PARANÁ, 2016). Ao longo de seus 18 km de extensão, o efluente é marcado por diferentes intervenções antrópicas, que resultam em uma variação nos estados de conservação do mesmo. A porção a montante do córrego se destaca pela presença do Parque Estadual Mata São Francisco, fragmento de mata atlântica conservado poucos km após a nascente. Por

sua vez, as porções intermediárias e a jusante são marcadas por áreas rurais com atividades agrícolas e pecuárias e estações de captação de água e tratamento de esgoto. Utilizando o Parque Estadual Mata São Francisco como referência, foram determinados três locais de estudo no ribeirão, sendo um à montante do parque e os outros dois à jusante.

O lago em que se encontra a nascente do ribeirão foi determinado como ponto A (PA). É uma porção represada do corpo d'água construída para atividades de aquicultura cercada por áreas agrícolas sem a presença de mata ciliar, na qual o sedimento tem aspecto predominante de areia e argila ($23^{\circ}9'45.95''S$ $50^{\circ}35'58.37''W$, Cornélio Procópio) (GALINDO *et al.*, 2023). O ponto B (PB) se localiza anteriormente a uma estação de abastecimento de água e próximo às estações complementares que integram a ETA Santa Mariana ($23^{\circ}9'35''S$ $50^{\circ}31'29''W$). Ele se caracteriza pelo fundo argiloso e pela ausência de mata ripária, substituída por grama e áreas de atividade agrícola ($23^{\circ}9'37.06''S$ $50^{\circ}31'26.10''W$, Santa Mariana) (GALINDO *et al.*, 2023). Segundo o Instituto das Águas do Paraná, o trecho que se inicia na nascente do manancial e vai até o ponto de captação de água deve se enquadrar em água doce de classe I (PARANÁ, 2016).

Por fim, o ponto C (PC) passa embaixo de uma ponte de estrada rural e chama atenção por se situar após a ETE Araras, estação que no ano de 2016 coletava 35% do esgoto municipal, tratando-o com 94% de eficiência na remoção de matéria orgânica (GALINDO *et al.*, 2023; PARANÁ, 2016). O sedimento da localidade é principalmente rochoso e arenoso e, apesar das árvores nativas e exóticas que se alternam com trechos de grama presentes na margem do ribeirão, a mata ciliar desse local também não se encontra preservada ($23^{\circ}9'47.70''S$ $50^{\circ}30'9.25''W$, Santa Mariana) (Figura 6B) (GALINDO *et al.*, 2023). O trecho do ribeirão no qual este ponto se encontra deve se enquadrar em água doce de classe II ou III (PARANÁ, 2016).

Figura 6 - Pontos de exposição dos espécimes de *A. trapesialis* no Ribeirão Água das Araras. A) Localização dos pontos gerada por satélite (Google Earth); B) Fotografias de PA, PB e PC.



Fonte: a própria autora.

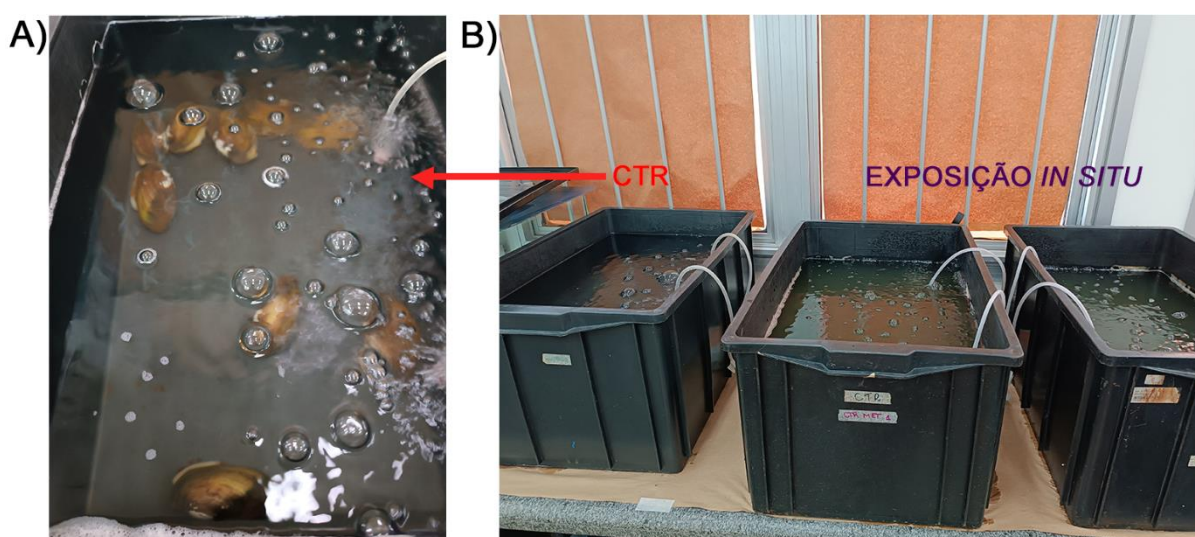
5.2 Delineamento experimental

Exemplares de *A. trapesialis* foram coletados no pesqueiro Toca do Jacaré e levados ao laboratório em sacos plásticos com água de seu local de origem e aeração adequada ($n = 40$; média \pm EP.: comprimento = $11,3 \pm 0,1$ cm; peso = $117,1 \pm 3,16$ g). Após o transporte, oito indivíduos tiveram seus tecidos amostrados no mesmo dia em que foram coletados, visando a avaliação das condições basais de onde os animais foram retirados, este grupo foi denominado grupo TOCA. Os demais animais foram organizados em quatro grupos amostrais ($n = 8$ /grupo) e durante sete dias: 1) expostos apenas à água desclorada, em laboratório (CTR); 2) confinado em

gaiolas no ponto A (PA); 3) confinados em gaiolas no ponto B (PB); 4) confinados em gaiolas no ponto C (PC).

Os animais do grupo CTR foram dispostos em uma caixa de 50 L com água desclorada sob aeração constante assim que chegaram ao laboratório (Figura 7). Neste ambiente permaneceram por sete dias, tendo sido realizada diariamente a renovação de 50% do meio e fornecida alimentação aos animais a cada 48h com algas *Raphidoceles subcatata* ($22,25 \times 10^7$ células/cm³).

Figura 7 - Animais levados da Toca do Jacaré ao laboratório. A) Grupo CTR; B) Disposição dos animais no laboratório.

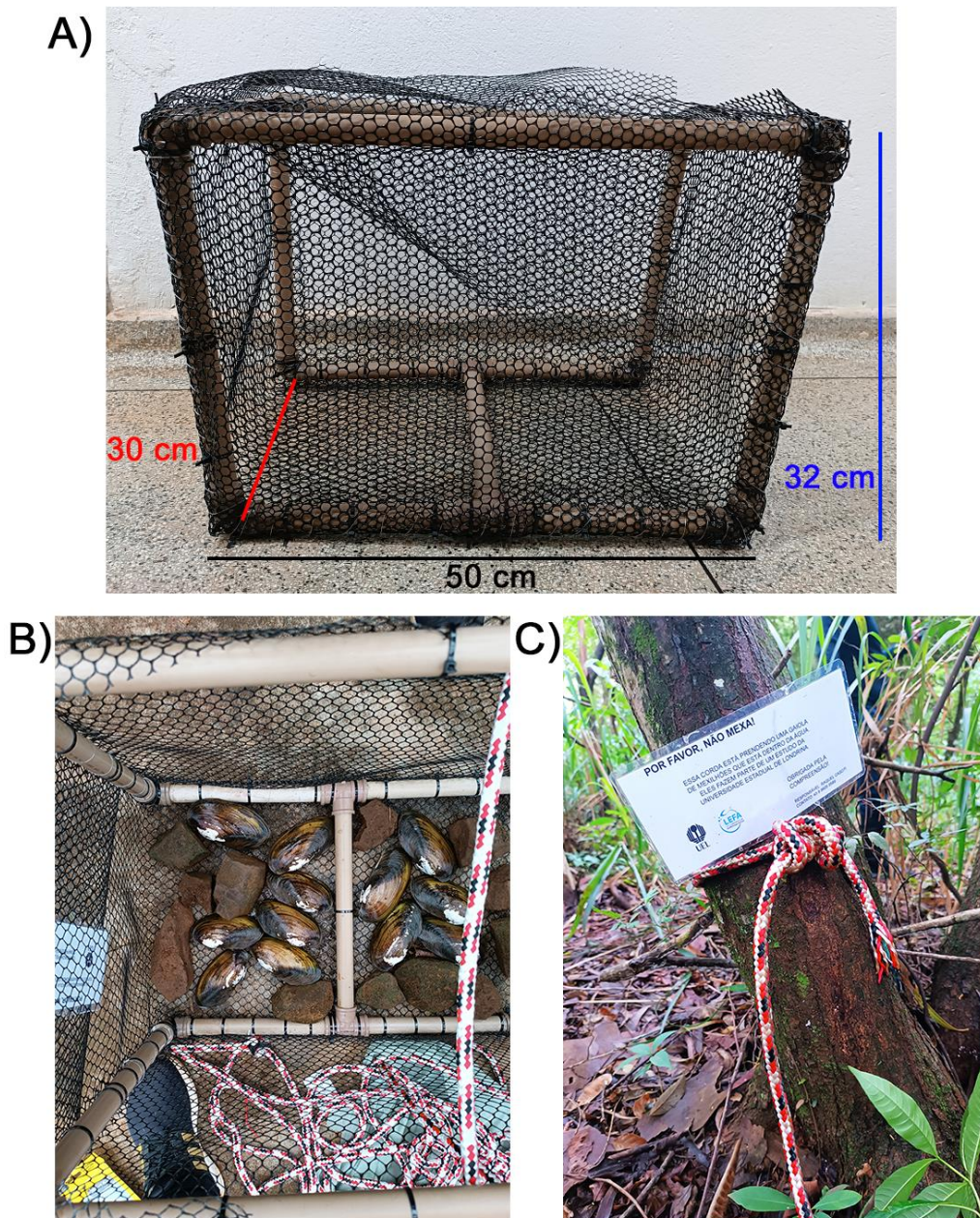


Fonte: a própria autora.

Os grupos de exposição *in situ* foram mantidos em laboratório até o dia seguinte à coleta, quando foram levados aos pontos de interesse. Durante a espera em laboratório os espécimes foram mantidos em duas caixas com 50 L da água de onde foram coletados sob aeração constante, enquanto para o transporte foram colocados em sacos plásticos preenchidos com essa mesma água, aerada por bombas de oxigênio portáteis (D-200, JAD Aquarium Co). Ao longo da semana de exposição ficaram em gaiolas de 30 x 32 x 50 cm (Figura 8A), colocadas nas áreas de estudo. Para evitar que os animais fossem levados pela correnteza e assegurar seu contato com o substrato, as gaiolas foram amarradas a árvores próximas a margem utilizando cordas identificadas e pedras encontradas no local foram adicionadas em seu interior (Figura 8B/C). Encerrado o tempo de exposição, os animais retornaram ao laboratório no dia 30 de novembro. Ao longo do trajeto de

transporte eles foram novamente mantidos em sacos com as águas de seus respectivos pontos, também em constante aeração.

Figura 8 - Animais expostos no Ribeirão Água das Araras. A) Gaiola com espécimes e pedras; B) Ponto de fixação da gaiola em árvore em PC; C) Placa de identificação das gaiolas amarrada às cordas.



Fonte: a própria autora.

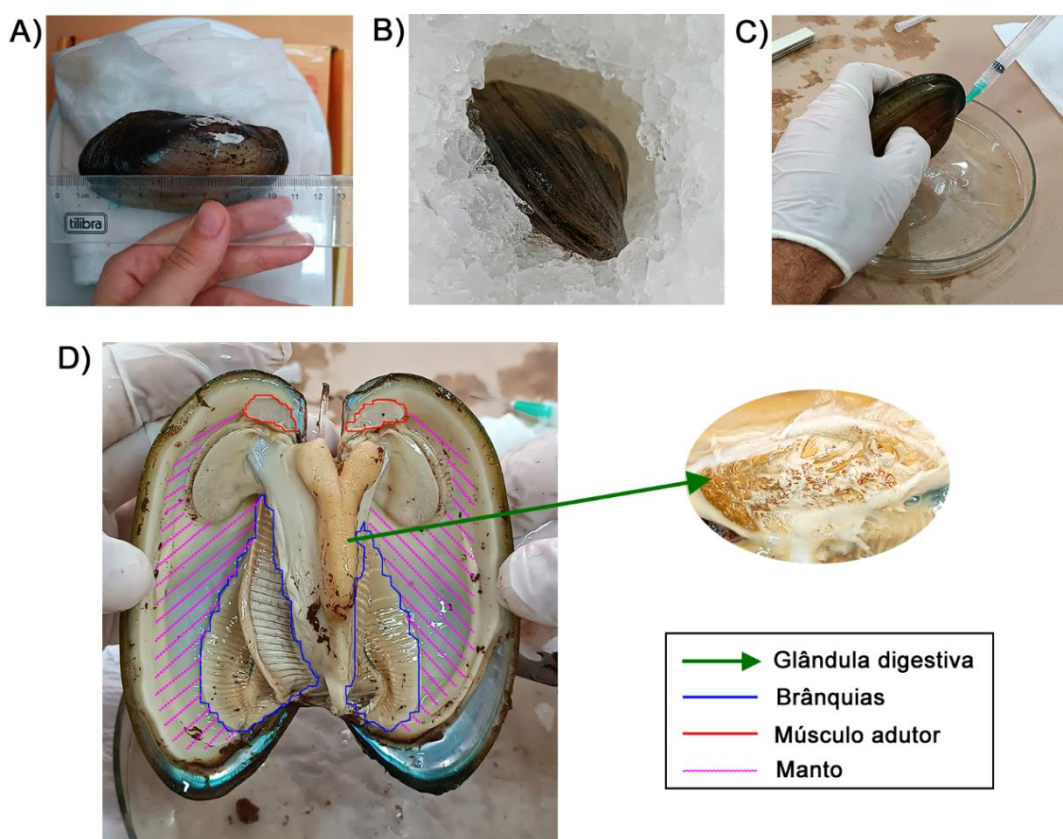
Os parâmetros físico-químicos da água dos ambientes foram medidos utilizando o medidor multiparâmetro Horiba-U52. No caso dos ambientes investigados, o medidor foi utilizado minutos antes da coleta (Toca do Jacaré) e no início e final da

exposição (pontos do Ribeirão Água das Araras). Já a água de exposição dos animais CTR foi avaliada diariamente. Ademais, foram coletadas amostras de água de todos os ambientes de exposição, armazenadas em tubos *falcon*, garrafas *pet* de 1,5 L encapadas com plástico preto e frascos plásticos esterilizados para análises de metais, nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) e coliformes fecais, respectivamente, a serem realizadas por laboratórios parceiros.

5.3 Amostragem

Em laboratório, os animais tiveram sua biometria verificada (comprimento e peso) (Figura 9A) e em seguida foram anestesiados em gelo para coleta de hemolinfa, extraída a partir do músculo adutor anterior com auxílio de uma seringa (Figuras 9B/C) e armazenada em freezer -20°C até o momento das análises. Em seguida, foram mortos a partir da secção dos músculos adutores anterior e posterior para a remoção dos órgãos restantes. Brânquias, glândula digestiva e manto foram retirados utilizando material cirúrgico e armazenados em ultrafreezer -70°C até o momento das análises (Figura 9D).

Figura 9 - Amostragem dos espécimes de *A. trapesialis*. A) Verificação de biometria; B) Anestesia em gelo; C) Coleta de hemolinfa a partir do músculo adutor anterior; D) Exemplar de *A. trapesialis* aberto com destaque para os órgãos removidos.



Fonte: a própria autora.

5.4 Análises dos biomarcadores

5.4.1 Estresse oxidativo

As amostras das brânquias, glândula digestiva e manto foram pesadas e homogeneizadas no sonicador (Q500 Sonicador, QSonica; m:v = brânquias e glândula digestiva: 1:4, manto: 1:3; 4°C; tempo = glândula digestiva e manto: 1 min 16 s, brânquias: 1 min 32 s; 4 s on / 6 s off) em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7) e centrifugadas (20000 g, 4 °C, 20 min). O sobrenadante foi utilizado para análises de biomarcadores de estresse oxidativo e determinação da quantidade de proteínas totais de cada amostra para padronização interindividual das amostras (BRADFORD, 1976) de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Volume de sobrenadante utilizado para as análises dos biomarcadores de bioquímicos (μL).

	<i>LPO</i>	<i>GSH</i>	<i>CAT</i>	<i>GST</i>	<i>proteínas</i>
<i>Glândula digestiva</i>	100	50	3	15	8
<i>Brânquias</i>	100	50	5	20	8
<i>Manto</i>	100	50	3	20	8

Fonte: a própria autora.

A avaliação da LPO foi realizada por meio do ensaio TBARS, segundo método proposto por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Para tanto se utiliza da reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) que, em meio ácido e com temperatura elevada (95°C), produz o complexo avermelhado MDA-TBA analisado em espectrofotometria de 530-540 nm. A concentração de TBARS foi expressa em $\text{nmol TBARS.mg ptn}^{-1}$.

A concentração do tripeptídeo glutationa (GSH) foi medida a partir da reação da glutationa com o substrato 5,5'-ditiobis-ácido-nitrobenzóico (DTNB). O tiolato, produto da reação, foi mensurado em espectrofotômetro a 412 nm e a concentração da GSH expressa em GSH.mg ptn^{-1} (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963).

A atividade da catalase (CAT) foi verificada através da decomposição do peróxido de hidrogênio H_2O_2 , catalisada pela enzima. A reação leva ao decaimento da absorbância em espectrofotômetro a 240 nm, expresso em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg.ptn}^{-1}$ (BEUTLER, 1975).

Por sua vez, a enzima de biotransformação glutationa-S-transferase (GST) teve sua atividade mensurada por meio da conjugação da glutationa reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), realizada pela GST da amostra. A quantificação do CDNB conjugado ocorreu em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da GST foi expressa em $\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{ mg.ptn}^{-1}$ (GILLIS *et al.*, 2014).

5.4.2 Concentração de glicose

A hemolinfa foi utilizada para determinação da concentração de glicose. Os valores de glicose foram medidos empregando o teste colorimétrico

(Glicose PAP Liquiform, Labtest Diagnóstica, Brasil), por meio do método enzimático glicose-oxidase em espectrofotometria a 505 nm, e expressos em mg dL^{-1} .

5.4.3 Concentração de íons

As concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-) na hemolinfa foram determinadas utilizando kits comerciais colorimétricos (Cálcio Liquiform e Cloreto Liquiform, Labtest Diagnóstica, Brasil). A quantificação de Ca^{2+} se deu a partir da reação dos íons com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, resultando em um complexo de coloração violeta medido em espectrofotometria a 570 nm. As concentrações de Cl^- foram mensuradas por meio da reação dos íons com o tiocionato de mercúrio e do produto desta com íons férricos, resultando em um composto amarelado, o qual foi medido por espectrofotometria a 470 nm.

As concentrações de sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram verificadas utilizando fotômetro de chama (DM-62, Digmed, Brazil) calibrado a partir de solução padrão de ambos os íons. Para esta quantificação a hemolinfa foi diluída em água deionizada em proporção 1:20.

5.4.4 Análise estatística

Os resultados referentes a cada biomarcador foram comparados entre os grupos (CTR x TOCA x PA x PB x PC) aplicando ANOVA para dados paramétricos ou Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos, de acordo com homogeneidade e homocedastidade da distribuição. Quando necessário, foram empregados os testes de comparações múltiplas Student-Neuman-Keuls (SNK) ou Dunn's para encontrar as diferenças significativas, respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos. O tratamento de dados foi realizado por meio do software Sigma Plot, sendo consideradas significativas diferenças em que $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros da água

Foram observadas diferenças na turbidez dos ambientes, tendo CTR valores próximos a 0 UNT e PA e PC próximos a 30 UNT, enquanto os níveis de TOCA e PB ultrapassaram 100 UNT. Os ambientes CTR, PA, PB e PC apresentaram semelhança no oxigênio dissolvido, porém no ambiente TOCA foram detectados apenas 2,73 mg L⁻¹. O ambiente PC também apresentou maior condutividade do que os demais.

Ainda, a quantidade de NO₃⁻ foi menor em PA do que em PB e PC. A presença de coliformes totais na água foi elevada em TOCA, PA, PB e PC, alcançando o limite superior identificável pela técnica utilizada. PA, PB e PC também apresentaram alta presença de *Escherichia coli*, com destaque para o PB que chegou a 2076,25 NMP 100 mL⁻¹.

Tabela 2 - Parâmetros físicos, químicos e biológicos da água.

PARÂMETROS DA ÁGUA	CTR	TOCA	PA	PB	PC
Temperatura (°C)	21,6	26,8	25,9	22,4	22,5
pH	7,03	6,22	6,33	6,46	6,77
Condutividade (uS/cm)	112	103	108,5	110	135
Turbidez (UNT)	0,325	^{#3} 121,6	35,85	^{#3} 155	21,65
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	6,7	⁴ 2,7	5,5	7,3	7,1
Total de sólidos dissolvidos (mg L ⁻¹)	36,0	67,0	40,0	71,5	87,5
NO ₃ ⁻ (mg N L ⁻¹)	-	-	0,44	1,71	1,4
NO ₂ ⁻ (mg N L ⁻¹)	-	-	n.d.	0,005	0,035
Coliformes totais (NMP 100 mL ⁻¹)	14,2	³ LDM	³ LDM	³ LDM	³ LDM
<i>Escherichia coli</i> (NMP 100 mL ⁻¹)	0	14,8	693,8	2076,25	685,15

^{#3}: valor além do aceitável para água doce de classe III (CONAMA).

³: valor inserido nos parâmetros para água doce de classe III (CONAMA).

⁴: valor inserido nos parâmetros de água doce de classe IV (CONAMA).

- : análise não realizada para o local.

LDM: limite de detecção do método (2419,6 NMP 100 mL⁻¹).

n.d.: não detectado.

Fonte: a própria autora.

6.2 Biomarcadores

6.2.1 Estresse oxidativo

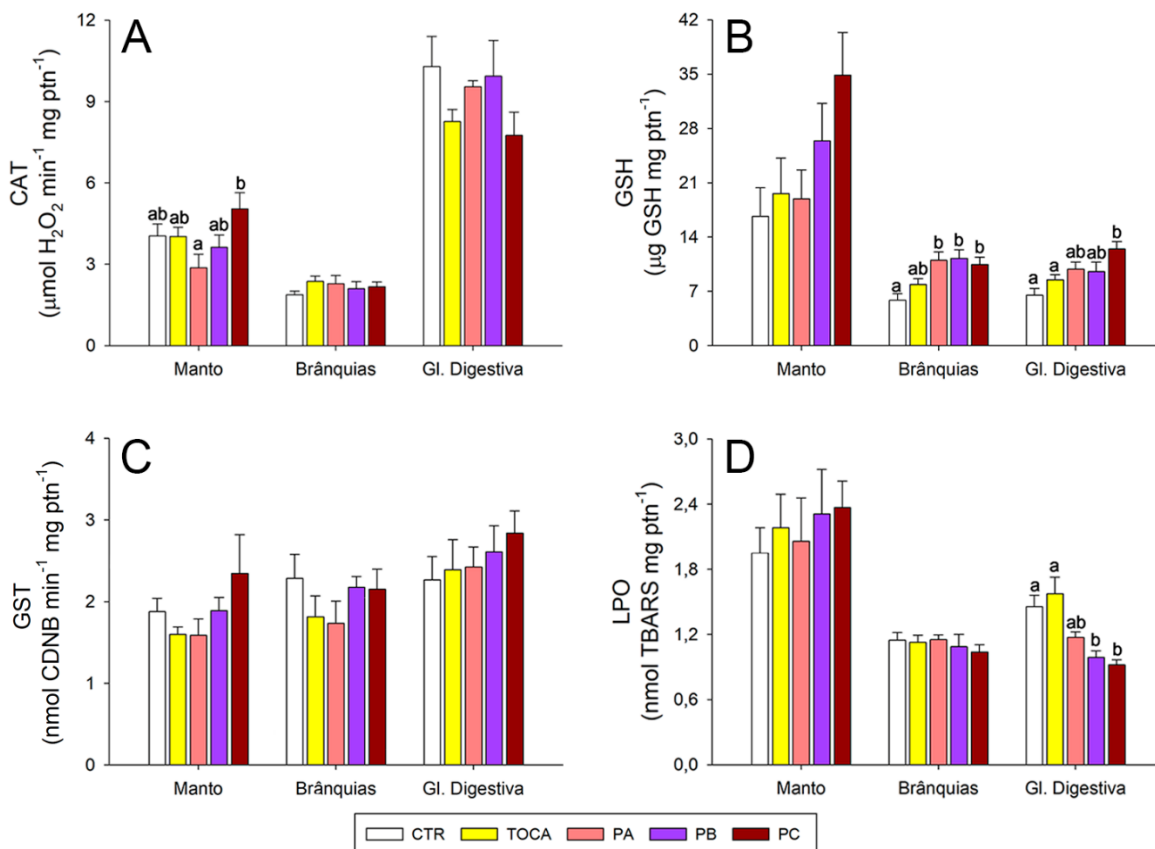
A atividade da CAT foi significativamente maior no manto dos animais de PC quando comparados aos de PA ($p = 0,024$). Entretanto, os resultados de ambos foram estatisticamente iguais quando comparados a CTR, TOCA e PB. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais para a atividade da CAT das brânquias e da glândula digestiva ($p = 0,418$; $0,394$) (Figura 10A).

Nas brânquias, as concentrações de GSH dos grupos PA, PB e PC foram iguais entre si, mas elevadas quando comparadas às do grupo CTR ($p = 0,002$; $0,002$; $0,003$). O grupo TOCA permaneceu igual a estes quatro grupos. Já na glândula digestiva ocorreu um aumento na concentração de GSH nos animais de PC quando comparados a CTR ($p = 0,001$) e TOCA ($p = 0,029$), mas não quando comparados a PA e PB. CTR, TOCA, PA e PB permaneceram iguais entre si. No manto não foi constatada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,05$) (Figura 10B).

A atividade de GST não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais em nenhum dos tecidos (manto: $p = 0,391$; brânquias: $p = 0,437$; glândula digestiva: $p = 0,568$) (Figura 10C).

Por fim, a glândula digestiva apresentou menor ocorrência de LPO em PB e PC quando comparados a CTR ($p = 0,03$; $0,003$) e TOCA ($p = 0,021$; $0,002$). Os grupos PB e PC permaneceram iguais entre si, assim como CTR e TOCA, enquanto PA foi semelhante a todos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto a ocorrência de LPO no manto ($p = 0,896$) e nas brânquias ($p = 0,800$) (Figura 10A).

Figura 10 - Biomarcadores bioquímicos analisados no manto, nas brânquias e na glândula digestiva de indivíduos *A. trapesialis* dos grupos CTR, TOCA, PA, PB e PC. A) atividade da catalase (CAT); B) concentração da glutatona reduzida (GSH); C) atividade da glutatona-s-transferase (GST); D) ocorrência de lipoperoxidação (LPO).



Fonte: a própria autora.

6.2.2 Concentração de glicose

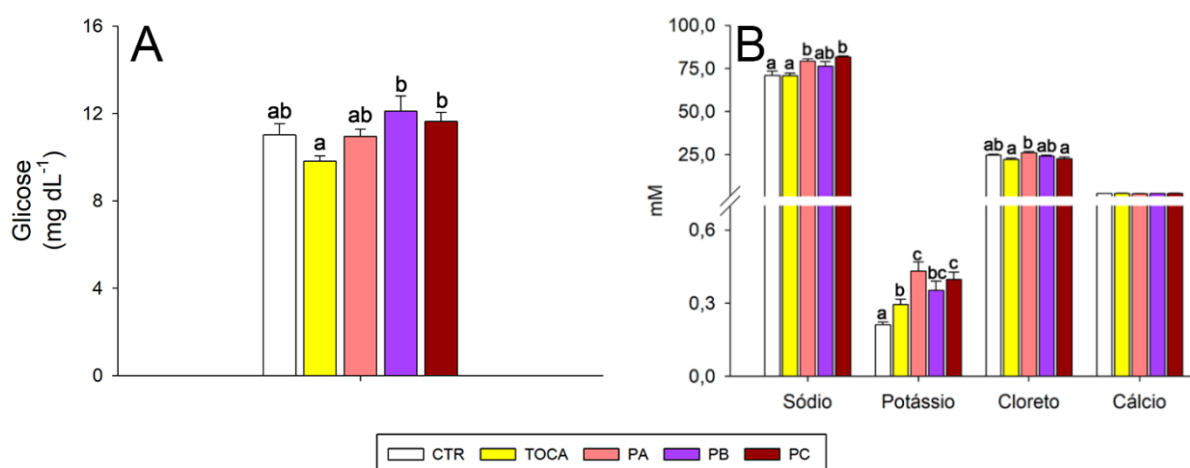
Foi observado um aumento na concentração de glicose na hemolinfa dos indivíduos de PB e PC, que permaneceram iguais entre si, quando comparados aos indivíduos de TOCA ($p = 0,009; 0,026$). Os grupos CTR e PA apresentaram valores estatisticamente iguais entre si e aos dos demais grupos (Figura 11A).

6.2.3 Concentração de íons

Na hemolinfa também foram encontradas mudanças nas concentrações iônicas. A análise de sódio (Na^+) indicou um aumento de sua concentração em animais de PA e PC quando comparados aos indivíduos de CTR (p

= 0,015; 0,003) e TOCA ($p = 0,03$; 0,006). O grupo PB apresentou resultados iguais aos demais grupos. Nas concentrações de potássio (K^+) foram observados aumentos nos grupos TOCA, PA, PB e PC quando comparados ao grupo CTR ($p = 0,047$; $< 0,001$; 0,004; $< 0,001$). Os animais de PA e PC apresentaram valores ainda mais elevados do que os de TOCA, porém semelhantes aos de PB ($p = 0,012$; 0,041). Houve um aumento significativo no conteúdo de cloreto (Cl^-) apenas em PA quando comparado a TOCA e PC ($p = 0,003$; 0,005), sendo que estes três grupos apresentaram valores estatisticamente semelhantes a CTR e PB. Entretanto, não foi observada diferença significativa nas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) entre os grupos experimentais ($p = 0,559$) (Figura 11B).

Figura 11 - Análises de biomarcadores da hemolinfa de animais *A. trapesialis* expostos aos ambientes CTR, TOCA, PA, PB e PC por sete dias. A) concentração de glicose e B) concentrações dos íons sódio, potássio, cloreto e cálcio. Média \pm E.P. (n=7-8). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas.



Fonte: a própria autora

7 DISCUSSÃO

Os dados encontrados para as análises de biomarcadores serão discutidos associando-os aos parâmetros da água disponíveis até o momento. Para isso, os resultados referentes às análises foram comparados aos valores de referência determinados na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005).

No momento das análises, o meio em que foi exposto o grupo CTR foi o único com parâmetros da água iguais aos de água doce de classe I. Considerando os resultados para presença de coliformes fecais, os três pontos investigados no ribeirão apresentaram valores semelhantes aos padrões de água de classe III. Contudo, é preciso reforçar que os resultados encontrados atingiram o limite detectável pela técnica empregada, logo o número exato de coliformes é incerto. Por sua vez, o ambiente de onde foram retirados os animais apresentou menos do que 4 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido, resultado que poderia enquadrá-lo em água doce de classe IV. TOCA e PB ainda apresentaram valores de turbidez que ultrapassaram os 100 UNT de referência para águas de classe III. Por mais que nenhum dos pontos do ribeirão tenham excedido os valores de referência de NO₃⁻, PA apresentou menos da metade das concentrações do ânion observadas em PB e PC. Não há parâmetros para condutividade da água na Resolução CONAMA 357/2005, porém PC apresentou resultados consideravelmente mais elevados do que os demais ambientes (Tabela 2).

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, para determinar a qual classe a água de um ambiente se enquadra é necessário um monitoramento constante do local por um amplo período de tempo (BRASIL, 2015). Isto não foi um objetivo do presente estudo, assim não houve intenção de inserir os ambientes nessa classificação e os valores de referência foram utilizados apenas para fins de comparação.

Segundo o Instituto das Águas do Paraná, o trecho que vai da nascente do ribeirão até a estação de captação de água da SANEPAR localizada poucos metros após PB deve se enquadrar em água doce de classe I, enquanto PC se encontra em um trecho determinado para classe III (PARANÁ, 2016). Porém, devido às suas localidades, é provável que os pontos de exposição dos grupos PA, PB e PC contenham inúmeros contaminantes. Estando inserido em uma área rural, a represa ao qual foi exposto PA pode apresentar misturas complexas de contaminantes orgânicos e inorgânicos derivados do emprego de agrotóxicos e fertilizantes nos

modelos agrícolas atuais, provavelmente adotados no local (CARRIQUIRIBORDE *et al.*, 2014, VIEIRA *et al.* 2016; VIEIRA *et al.*, 2017). Dos pontos avaliados, PB é o primeiro à jusante do Parque Estadual Mata São Francisco, portanto pode sofrer influência da área de conservação. Contudo, também se encontra logo antes de uma estação que capta água para ser tratada. Ainda, PC se encontra à jusante uma ETE, que pode liberar contaminantes orgânicos e inorgânicos, tais como metais, fármacos, cosméticos e agrotóxicos em seu efluente (BIANCHI *et al.*, 2016; CAREY; MIGLIACCIO, 2009).

A exposição a compostos tóxicos como os que podem estar presentes nas três localidades é um dos fatores que pode levar ao estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e a ação de moléculas antioxidantes que pode ocasionar danos estruturais e funcionais (MONSERRAT, 2021, VAN DER OOST *et al.*, 2005). Dentre as defesas antioxidantes avaliadas, a enzima CAT apresentou variações apenas no manto, se mostrando mais ativa no grupo PC quando comparado ao grupo PA. O manto é um tecido que apresenta contato direto com o meio em que o animal se encontra e, conseqüentemente, com os contaminantes presentes nele. Além disso, frequentemente a CAT é uma das primeiras defesas antioxidantes a ser induzida, atuando na degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (MONSERRAT, 2021). Esse aumento da atividade da CAT foi igualmente observado em trutas arco-íris expostas a água de ETA, associando-o a produção de pró-oxidantes pelos animais (STURVE; ALMROTH; FÖRLIN, 2008).

Também foram observadas alterações nas concentrações de GSH. A GSH é tripeptídeo que atua como antioxidante não enzimático ao ser conjugada ou se ligar espontaneamente a um contaminante e seus intermediários eletrofílicos, garantindo a redução de oxidantes e a eliminação de radicais livres (MONSERRAT, 2021; NEWTON; COPE, 2007; NIKINMA, 2014). Na glândula digestiva ocorreu um aumento nas concentrações de GSH em PC quando comparado a CTR e TOCA, já nas brânquias foram encontradas maiores concentrações da molécula nos grupos PA, PB e PC quando comparados a CTR e TOCA. A glândula digestiva é o principal órgão de biotransformação dos bivalves, assim tende a apresentar respostas nos biomarcadores de estresse oxidativo (TESSER *et al.*, 2022). Por sua vez, as brânquias interagem diretamente com o meio ao filtrar grandes quantidades de água para captura de alimento, tendo contato tão íntimo com os contaminantes quanto o

observado no manto (HASSEL; FARRIS, 2006). As responsáveis por realizar a conjugação da GSH a compostos tóxicos são as GST, enzimas de biotransformação de fase II, contudo não ocorreram diferenças significativas na atividade da GST em nenhum dos tecidos avaliados quando comparados os grupos.

As elevações nas concentrações de GSH e na atividade da CAT parecem ter neutralizado as espécies reativas de oxigênio, levando à diminuição da LPO na glândula digestiva em PB e PC quando comparados à CTR e TOCA e evitando o aumento da peroxidação lipídica nos demais tecidos avaliados (NEWTON; COPE, 2007; NIKINMA, 2014). Cossu *et al.* (2000) observaram uma relação inversa entre a LPO e as defesas antioxidantes, mas com resultados que apontaram um aumento dos danos e uma diminuição das defesas. Ainda, a diminuição de LPO em bivalves expostos a ambientes contaminados já foi observada e relacionada ao aumento da defesa antioxidante previamente, porém em ambientes costeiros (DIODATO *et al.*, 2021). Portanto, considerando a dinâmica entre danos oxidativos e defesas antioxidantes observada neste trabalho, é possível que os ambientes aos quais os animais foram expostos tenham levado à formação de espécies reativas de oxigênio em seus organismos.

Ademais, quando foram retirados dos locais de exposição tanto os indivíduos de PB quanto de PC possuíam valvas encerradas, e um animal de cada grupo se encontrava morto. Esse cenário não foi observado no grupo PA, no qual todos os animais sobreviveram e alguns apresentavam o pé exposto e as valvas semiabertas ao fim da exposição. Assim, é provável que a mistura de contaminantes presentes em PB e PC tenha a uma toxicidade maior do que a de PA.

Teles, Pacheco e Santos (2007) observaram que enguias expostas em um lago contaminado por compostos aplicados na agricultura e por efluentes industriais e domésticos apresentaram aumento de glicose, também verificado em respostas de outras espécies de peixes à contaminação por metais e agrotóxicos (MARTINEZ *et al.*, 2004). Assim, é possível que a concentração de glicose na hemolinfa em PB e PC foi maior do que em TOCA devido aos contaminantes presentes nos ambientes. Contudo, essa diferença também pode ter decorrido do baixo oxigênio dissolvido na água da TOCA e, portanto, seja a glicose de TOCA que tenha reduzido. A produção energética pode ocorrer de forma anaeróbica, através do processo de glicólise, ou de forma aeróbica, no qual a glicólise é seguida pelo ciclo de Krebs e pela fosforilação oxidativa. Compreende-se que as etapas adicionais da respiração

aeróbica garantem um saldo energético maior do que o resultante da respiração anaeróbica a partir de uma única molécula (NIKINMA, 2014). Portanto, em um ambiente com pouco oxigênio disponível o organismo tenderá a produção energética anaeróbica, acarretando em maior consumo de glicose e conseqüente diminuição na concentração da mesma.

Por habitarem locais de água doce com baixa concentração de íons, os bivalves unionides precisam acumular e reter solutos para assegurar o equilíbrio osmótico. Esses animais se mantêm hiperosmóticos excretando amplos volumes de água e obtendo íons através da alimentação e por transportadores epiteliais (NEWTON; COPE, 2007). Em unionides a difusão de íons pode ocorrer através de junções celulares frouxas presentes no epitélio caracteristicamente vazado, porém a manutenção dos fluídos hiperosmóticos é garantida pelo cotransporte entre íons essenciais e residuais e pelo transporte iônico ativo, ambos recorrentes nas brânquias ctenídeo (CUMMINGS; GRAF, 2015). Apesar de até o momento não ter sido avaliada a concentração de metais, sabe-se que ambientes antropizados e efluentes de ETE podem conter inúmeros metais, capazes de interferir no transporte iônico transepitelial em quadros de exposição aguda ou crônica (NEWTON; COPE, 2007; SOUZA *et al.*, 2024).

Indivíduos da espécie *Anodonta cygnea* expostos à cádmio e exemplares de *Anodonta grandis* expostos à sulfato de alumínio apresentaram diminuição do Na^+ presente na hemolinfa. Ainda no segundo grupo essa variação ocorreu simultaneamente a diminuição de Cl^- e ao aumento de Ca^{2+} (NEWTON; COPE, 2007). Bivalves da espécie *A. trapesialis* também apresentaram diminuição em Na^+ e Cl^- quando expostos a nanopartículas de prata (TESSER *et al.*, 2022).

Neste foram observadas diferenças estatísticas entre TOCA e PC quando comparados a PA, porém como ambos permaneceram iguais ao grupo CTR não é possível afirmar se houve de fato uma queda em TOCA e PC ou um aumento em PA. Em PC houve um aumento de Na^+ e K^+ quando comparado a CTR e TOCA, igual ao ocorrido em PA. Os animais de PB apresentaram apenas o aumento de K^+ , similar tanto aos de TOCA quanto aos de PA e PC. Já a TOCA mostrou concentrações de K^+ maiores do que em CTR, porém não tão elevadas quanto PA e PC. Mesmo com desvios nas concentrações iônicas evidenciados, Tesser *et al.* (2022) não encontraram alterações no funcionamento das ATP-ases relacionadas. Considerando esse resultado e a improvável modificação das membranas celulares das brânquias

devido à ausência da LPO nesse tecido, é possível que os metais interfiram em transportadores passivos e cotransportadores e, portanto, estejam presentes nos ambientes TOCA, PA, PB e PC.

8 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados mostraram alterações na dinâmica entre defesa antioxidante e danos oxidativos, indicando uma possível presença de compostos que podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio nos pontos avaliados do Ribeirão Água das Araras.

As variações observadas nos níveis de glicose nos pontos PB e PC quando comparados a TOCA podem ter decorrido da diferença de O_2 dissolvido, expressivamente menor em TOCA, ou ainda da presença de possíveis contaminantes em PB e PC.

Tanto o tanque da Toca do Jacaré quanto os pontos do Ribeirão parecem conter compostos que interfiram na permeabilidade iônica transepitelial, tais como metais, que podem ter interferido em transportadores passivos e cotransportadores. Ademais, devido ao fechamento das valvas dos animais e a ocorrência de mortes em PB e PC, esses dois ambientes podem apresentar misturas de contaminantes mais tóxicas, no caso de PC provavelmente devido à proximidade com a ETE.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental science. Processes & impacts**, 18, n. 7, 2016. 779-787. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27367607/>>. Acesso em: 01 nov 2023.

AMARAL, A. C. Z. et al. A situação de ameaça dos invertebrados aquáticos do Brasil. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, Brasília, 2008. 218. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001723479>>. Acesso em: 25 out 2023.

AMIARD, J.-C.; AMIARD-TRIQUET, C. Quality Standard Setting and Environmental Monitoring. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks**. Londres: Academic Pres, 2015. Cap. 3, p. 51-76. ISBN: 978-0-12-800949-9.

AMIARD-TRIQUET, C. Introduction. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks**. Londres: Academic Pres, 2015. Cap. 1, p. 1-23. ISBN: 978-0-12-800949-9.

BERTHET, B. Reference Species. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks**. Londres: Academic Pres, 2015. Cap. 9, p. 205-227. ISBN: 978-0-12-800949-9.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of 20 blood glutathione. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, p. 882–21 888, 1963.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.

BIANCHI, V. et al. Modulating effects of orally supplied *Euglena gracilis* on the physiological responses of the freshwater mussel *Diplodon chilensis*, exposed to sewage water pollution in a Patagonian river (Argentina). **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.]: 2016, vol. 51, p. 17-25. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.02.016

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA N° 20, DE 18 DE JUNHO DE 1986. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1986/res_conama_20_1986_revvd_classificacaoaguas_altrd_res_conama_274_2000_revvd_357_2005.pdf>. Acesso em: 20 abr 2024.

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 20 abr 2024.

BRASIL. Resolução No 430, de 13 de maio de 2011. Secretaria do estado de saúde de Minas Gerais, 2011. Disponível em: <<https://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Resolucao%20CONAMA%20430%20de%2013%20de%20maio%20de%202011.pdf>>. Acesso em: 20 abr 2024.

BOENING, D. W. An Evaluation Of Bivalves As Biomonitors Of Heavy Metals Pollution In Marine Waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, 55, n. 3, 1997. 459-470. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1005995217901>>. Acesso em: 01 nov 2023.

CAZENAVE, D. J.; AMÉ, V.; MENONE, D. M. Biomarcadores de Contaminación. In: CARRIQUIRIBORDE, P. **Principios De Ecotoxicología**. La Plata: EDULP, 2021. p. 291-309. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/351920003_Principios_de_Ecotoxicologia>. Acesso em: 25 out 2023.

CHAHOURI, A. et al. Bivalve molluscs as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Recent advances. **Continental Shelf Research**, 264, 2023. 105056. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278434323001334>>. Acesso em: 27 out 2023.

CAREY, R. O.; MIGLIACCIO, K. W. Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems: a review. **Environmental**

management, 44, n. 2, 2009. 205-217. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19458999/>>. Acesso em: 02 nov 2023

CARRIQUIRIBORDE, P. Introdução. In: CARRIQUIRIBORDE, P. **Principios De Ecotoxicología**. La Plata: EDULP, 2021. p. 10-26. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/351920003_Principios_de_Ecotoxicologia>. Acesso em: 25 out 2023;

COSSU, C. et al. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.]: 2000, vol. 45, p. 106-121. DOI: 10.1006/eesa.1999.1842

CUEZZO, Maria Gabriela et al. Chapter 11 - Phylum Mollusca. In: ROGERS, D. Christopher; DAMBORENEA, Cristina; THORP, James (ed.). **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**: Volume 5: Keys to Neotropical and Antarctic Fauna. 4. ed. [S. l.: s. n.], 2020. v. 5, cap. 11, p. 261-430. ISBN 978-0-12-804225-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128042250000113>. Acesso em: 10 out. 2023.

CUMMINGS, K.; GRAF, D. Class Bivalvia. In: **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**: Ecology and General Biology, [s. l.]: 2015, vol. 1, p. 423 – 506. DOI: 10.1016/B978-0-12-385026-3.00019-X

DIODATO, S. et al. Integrated biomarker response in *Mytilus chilensis* exposed to untreated urban discharges along the coast of Ushuaia Bay (Beagle Channel, Argentina). **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.]: 2021, vol. 28, p. 39892–39906 DOI: 10.1007/s11356-021-13587-1/Published

DUNN, H. L.; FARRIS, J. L.; HASSEL, J. H. V. Case Study: Impact of Partially Treated Mine Water on an Ohio River (U.S.A.) Mussel Bed—Use of Multiple Lines of Evidence in Impact Analysis. In: FARRIS, J. L.; HASSEL, J. H. **Fishwater bivalve ecotoxicology**. Nova Iorque: SETAC Books, 2006. Cap. 13, p. 335-350. ISBN 1-880611-67-8.

ENNS, D. et al. Flushing away the future: The effects of wastewater treatment plants on aquatic invertebrates. **Water Research**, 2023, 243. 120388. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135423008242>>. Acesso em: 02 nov 2023

FERNANDES, F. et al. Urban aquatic pollution – Brazil. **Urban Pollution: Science and Management**, [s. l.]: 2018, p. 357-370. DOI: 10.1002/9781119260493.ch27

GALINDO, B. A. et al. Ichthyofauna of the Água das Araras stream, Paranapanema River basin, upper Paraná River system, Southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and environment**, 58, n. 2, 2023. 384-398. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01650521.2021.1967690>>. Acesso em: 03 nov 2023.

GILLIS, P. et al. The impact of municipal wastewater effluent on field-deployed freshwater mussels in the Grand River (Ontario, Canada). **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.]: 2014, vol. 33, p. 134 – 143. DOI: 10.1002/etc.2401

GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field Studies. In: RAND, M. G. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Florida: CRC Press, 1995. Cap. 9, p. 257 – 305, ed. 2.

HELMHOLZ, H. et al. Seasonal and annual variations in physiological and biochemical responses from transplanted marine bioindicator species *Mytilus* spp. during a long term field exposure experiment. **Science of The Total Environment**, 565, 2016. 626-636. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716309056>>. Acesso em: 30 out 2023.

HASSEL, J. H. V.; FARRIS, J. L. Freshwater Bivalve Ecotoxicology. In: FARRIS, J. L.; HASSEL, J. H. **Fishwater bivalve ecotoxicology**. Nova Iorque: SETAC Books, 2006. Cap. 1, p. 1-17. ISBN 1-880611-67-8.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII - Invertebrados. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio. 727p.

JONES, E. R. et al. Country-level and gridded estimates of wastewater production, collection, treatment and reuse. **Earth System Science Data**, [s. l.]: 2021, vol. 13 (2), p. 237–254. DOI: <https://doi.org/10.5194/essd-13-237-2021>.

MARTINEZ, C. B. R. et al. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.]: 2004; 64:797–807.

MIGLIORANZA, K. Principales familias de contaminantes, fuentes, distribución y destino ambiental. In: CARRIQUIRIBORDE, P. **Principios De Ecotoxicología**. La Plata: EDULP, 2021. p. 27-62. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/351920003_Principios_de_Ecotoxicologia>. Acesso em: 25 out 2023.

MONSERRAT, J. M. Estrés Oxidativo. In: CARRIQUIRIBORDE, P. **Principios De Ecotoxicología**. La Plata: EDULP, 2021. p. 116-126. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/351920003_Principios_de_Ecotoxicologia>. Acesso em: 25 out 2023.

NEWMAN, M. C.; CLEMENTS, W. H. **Ecotoxicology**: A Comprehensive treatment. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2008. p 3-11. ISBN-13: 978-0-8493-3357-6.

NEWTON, T. J.; COPE, W. G. Biomarker Responses of Unionid Mussels o Environmental Contaminantes. **Fishwater bivalve ecotoxicology**. Nova Iorque: SETAC Books, 2006a. Cap. 10, p. 257-284. ISBN ISBN 1-880611-67-8.

NIKINMAA, M. **An introduction to aquatic toxicology**. Kidlington: Elsevier, 2014. ISBN ISSN 978-0-12-411574-3.

OHKAWA, H.; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, [s. l.]: 1979(2), 351–358. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

OLIVEIRA, L. F. D. Toxicidade Do Chorume De Aterro Doméstico: Avaliação Por Meio De Biomarcadores Em Bivalves. **Mestrado em Ciências Biológicas: Zoologia Botânica**, Londrina, 2012.

OLIVEIRA, L. F. D. et al. Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the Neotropical freshwater clam *Anodontites trapesia*: Implications for monitoring coal mining areas. **Science of The Total Environment**, 571, 2016. 983-991. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716315327>>. Acesso em: 30 out 2023.

PARANÁ. Produto 05 – Parte A: Estudos Específicos – Reenquadramento de corpos d'água e plano de efetivação do enquadramento. **Elaboração do plano das Bacias do Cinzas, Itararé e Paranapanema 1 e 2**. 2016.

RAND, M. G.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, M. G. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Florida: CRC Press, 1995. Cap. 1, p. 3 – 67, ed. 2.

SANTOS, C. Metabolismo tecido-específico de benzo[a]pireno no peixe *Prochilodus lineatus*: uma abordagem temporal. **Doutorado em Genética e Biologia Molecular**, Londrina, 2020.

SOUZA, A. C. Z. *et al.*. Ecotoxicological aspects and environmental implications of the use of water and sewage treatment sludges. **International Journal of Environmental Science and Technology**, vol. 21, p. 3527–3552, 2024.

STURVE, J.; ALMORTH, B; FÖRFLIN, L. Oxidative stress in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.]: 2008, vol. 70, p. 446 – 452. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.02.016

SILVA, V. et al. Bioaccumulation of Toxic Metals in Freshwater Fish in Brazil: Gaps, Applications, and Future Directions for Environmental Biomonitoring. **Water, Air and Soil Pollution**, [s. l.]: 2023, vol. 234. DOI: 10.1007/s11270-023-06682-1.

TELES, M.; PACHECO, M., SANTOS, M. Endocrine and metabolic responses of *Anguilla anguilla* L. caged in a freshwater-wetland (Pateira de Fermentlos-Portugal). **Science of the Total Environment**, [s. l.]: 2007, vol. 372, p. 562-570. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.10.033

TESSER, M. E. et al. Biogenic metallic nanoparticles (Ag, TiO₂, Fe) as potential fungicides for agriculture: are they safe for the freshwater mussel *Anodonta imbecilis*? **Chemosphere**, 309, 2022. 136664. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653522031575>>. Acesso em: 28 out 2023.

THORSEN, W. A.; COPE, W. G.; SHEA, D. Toxicokinetics of Environmental Contaminants in Freshwater Bivalves. **Freshwater bivalve ecotoxicology**. Nova Iorque: SETAC Books, 2006a. Cap. 8, p. 169-214. ISBN 1-880611-67-8.

VAN DER OOST, R. et al. Biomarkers in environmental assessment. **Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems; emerging techniques, trends, and strategies**, 2005. 87-152. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/40112529_Biomarkers_in_environmental_assessment>. Acesso em: 28 out 2023.

VIEIRA, C. L. D. et al. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, [s. l.]: 2016, vol. 542 (A), p. 44 – 46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.0265.10.071>

VIEIRA, C. L. D. et al. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of The Total Environment**, [s. l.]: 2017, vol. 586, p. 598 – 609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.026>

YOUNG, D. R.; HEESEN, T. C.; MCDERMOTT, D. J. An offshore biomonitoring system for chlorinated hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**, 7, n. 8, 1976. 156-159. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0025326X7690134X>>. Acesso em: 20 out 2023.

WATTERS, G. T. A Brief Look at Freshwater Mussel (Unionacea) Biology. In: FARRIS, J. L.; HASSEL, J. H. **Freshwater bivalve ecotoxicology**. Nova Iorque: SETAC Books, 2006. Cap. 3, p. 51-64. ISBN 1-880611-67-8.