



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

MAÍRA DE VASCONCELOS LIMA SAMPAIO

**USO DO MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* NA MONITORAÇÃO DAS ÁGUAS
DO RIO CAPIBARIBE**

Recife
2021

MAÍRA DE VASCONCELOS LIMA SAMPAIO

**USO DO MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* NA MONITORAÇÃO DAS ÁGUAS
DO RIO CAPIBARIBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir De França.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

S192u Sampaio, Máira de Vasconcelos Lima.
Uso do molusco *Biomphalaria glabrata* na monitoração das águas do Rio Capibaribe / Máira de Vasconcelos Lima Sampaio. - 2022.
100 folhas, il.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2022.

Inclui Referências.

1. Energia Nuclear. 2. Genotoxicidade. 3. Mutagenicidade.
4. Monitoração ambiental. 5. *Biomphalaria glabrata*. I. França, Elvis Joacir de (Orientador). II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (Coorientadora).
III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.)

BCTG/2022-167

MAÍRA DE VASCONCELOS LIMA SAMPAIO

**USO DO MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* NA MONITORAÇÃO DAS ÁGUAS
DO RIO CAPIBARIBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco do Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente.

Aprovado em: 27/09/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elvis Joacir De França (Orientador)
Comissão Nacional de Energia Nuclear – CRCN/CNEN-NE

Prof. Dr. Thiago Oliveira dos Santos (Examinador Externo)
Comissão Nacional de Energia Nuclear – CRCN/CNEN-NE

Dra. Luanna Ribeiro Santos Silva (Examinador Externo)
Centro Universitário FACOL – Unifacol

Dra. Hianna Arely Milca Fagundes Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me proporcionou chegar até aqui, e muitas vezes, apesar da minha pouca fé, sempre me guiou na direção certa.

Aos meus pais amados, Josimar e Luci, por tudo o que ainda fazem por mim, todos os dias da minha vida. Por serem minha maior inspiração e meu exemplo de amor e honestidade. As minhas irmãs, Mona Lizza e Monique, pelo amor sincero, pela confiança e pelo apoio. A minha doce sobrinha, Dandara.

A Lucas Sampaio, meu marido, que mais uma vez se mostrou companheiro e meu melhor amigo, me apoiando em todos os momentos difíceis dessa caminhada!

A meu orientador, Prof. Dr. Elvis França, que aceitou embarcar junto comigo nesse campo desconhecido, sempre muito solícito e dedicado a pesquisa. Seus ensinamentos foram essenciais para minha formação durante o doutorado. Obrigada pela confiança!

A minha coorientadora Profa.Dra. Ana Melo, por ser um ser de luz na vida de cada estudante que passa no laboratório, por confiar no meu trabalho desde a Iniciação Científica, por todos os ensinamentos e dedicação, não só no âmbito acadêmico, mas também nos pequenos momentos do dia a dia. E sem dúvida pela oportunidade de poder dar continuidade a minha carreira acadêmica. Muito obrigada!

A todos do Laboratório de Radiobiologia, Ingrid, Hianna, Will, Luís, Douglas, Katarine, Vinícius e Dewson, que sempre estiveram disponíveis em tirar minhas dúvidas e dividir comigo seus conhecimentos. A todos do Laboratório do SEAMB, Jullyanne, Marcelo Magalhães, Marcelo Belmiro, Ian Lucas e Bruno Silva que sempre mostraram que não existe tempo ruim com vocês, obrigada por toda ajuda!

Obrigada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN) por todo o suporte durante o doutorado, a CNEN pelo apoio financeiro. Em especial, a todos os professores que contribuíram ao longo da caminhada acadêmica para que pudesse chegar a esse momento. E a todos que de alguma forma contribuíram, muito obrigada!

“Sonho que se sonha só.
É só um sonho que se sonha só.
Mas sonho que se sonha junto é realidade”!
(Seixas, 1974)

RESUMO

Atividades antropogênicas e industriais em áreas próximas a rios leva à degradação da qualidade das águas superficiais e subterrâneas, e a perturbação dos organismos que habitam nesse ecossistema. Nesse trabalho, foram analisados os parâmetros físico-químicos das águas superficiais do rio Capibaribe, quantificação dos elementos-traço em sedimentos em suspensão e de fundo, os efeitos mutagênicos, genotóxicos e de bioacumulação nos moluscos *Biomphalaria glabrata*. Para avaliação dos testes foram coletadas amostras da água do rio (P1=Recife, P2=Salgadinho, P3=Toritama e P4=Santa Cruz do Capibaribe) nas estações seca e chuvosa. Foram analisados pH e condutividade no momento da coleta, além da coleta de sedimento de fundo de rio. Os sedimentos e a bioacumulação foram avaliados por meio de técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica. Os resultados apresentaram valores de pH da água do rio dentro do limiar aceitável (6,2 a 7,7) em ambas as estações, e valores elevados de condutividade (entre 0,13 a 6,5 mS.cm⁻¹), principalmente na estação seca, indicando impacto ambiental. O índice de poluição dos sedimentos apresentou altamente poluídos em P4. As concentrações dos elementos-traço foram maiores na estação chuvosa do que na estação seca. As amostras de águas coletadas do ponto P4 foram tóxicas para os embriões e moluscos adultos, onde foi verificado 100% de mortalidade em ambos os testes na estação chuvosa, impossibilitando assim a avaliação dos demais testes com esse ponto. A diferença significativa de micronúcleo e binucleação entre as duas estações no P3, evidencia o potencial mutagênico e genotóxico de águas poluídas com resíduos industriais têxteis, tendo em vista que em P1 e P2 não houve diferença significativa. O Ensaio do cometa ressaltou o impacto que P3 vem sofrendo através da fragmentação do DNA e o aumento de graus de danos nível 4, nos demais pontos o maior grau foi o nível 0. Os moluscos bioacumularam cromo, presente na estação seca em P3. Portanto, os resultados demonstraram que o rio Capibaribe sofre bastante impacto ambiental próximos a regiões têxteis, como também mostrou a sensibilidade que o molusco *Biomphalaria glabrata* tem diante de testes de monitoração ambiental.

Palavras-chave: genotoxicidade; mutagenicidade; monitoração ambiental; *Biomphalaria glabrata*.

ABSTRACT

Anthropogenic and industrial activities in areas close to rivers lead to the degradation of the quality of surface and groundwater, and the disturbance of the organisms that inhabit this ecosystem. In this work, the physicochemical parameters of the surface waters of the Capibaribe River, quantification of trace elements in suspended and bottom sediments, the mutagenic, genotoxic, and bioaccumulative effects on the mollusks *Biomphalaria glabrata* were analyzed. To evaluate the tests, samples of river water were collected (P1=Recife, P2=Salgadinho, P3=Toritama and P4=Santa Cruz do Capibaribe) in the dry and rainy seasons. The pH and conductivity were analyzed at the time of collection, in addition to the collection of river bottom sediment. Sediments and bioaccumulation were evaluated using Atomic Absorption Spectrometry techniques. The results showed pH values of water from the river within the acceptable threshold (6.2 to 7.7) in both seasons, and high values of conductivity (between 0.13 and 6.5 mS.cm⁻¹), mainly in the dry season, indicating an environmental impact. The sediment pollution index was highly polluted in P4. Trace element concentrations were higher in the rainy season than in the dry season. The water samples collected from point P4 were toxic to embryos and adult mollusks, where 100% mortality was verified in both tests in the rainy season, making it impossible to evaluate the other tests with this point. The significant difference in micronucleus and binucleation between the two stations at P3 evidences the mutagenic and genotoxic potential of polluted waters with textile industrial residues, considering that at P1 and P2 there was no significant difference. The Comet Assay highlighted the impact that P3 has been suffering through DNA fragmentation and the increase in damage levels at level 4, in other points, the highest degree was level 0. The mollusks bioaccumulate chromium, present in the dry season in P3. Therefore, the results showed that the Capibaribe River suffers many environmental impacts close to textile regions, as well as showing the sensitivity that the mollusk *Biomphalaria glabrata* has to environmental monitoring tests.

Keywords: genotoxicity; mutagenicity; environmental monitoring; *Biomphalaria glabrata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Rio Capibaribe/PE.	20
Figura 2 -	Moluscos adultos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> .	24
Figura 3 -	Esquema de um animal do gênero <i>Biomphalaria</i> retirado da concha, com a indicação de seus órgãos internos.	24
Figura 4 -	Células da hemolinfa (aumento de 1000x). A) hialinócito; B) granulócito.	26
Figura 5 -	Estágios embrionários do <i>Biomphalaria glabrata</i> . A) blástula; B) gástrula; C) trocófora; D) véliger e E) hippo stage.	27
Figura 6 -	Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica (modelo de chamas - FAAS).	31
Figura 7 -	A) Embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> em exposição de 24 h, observados diariamente durante 8 dias, expostos ao cromo ($K_2Cr_2O_7$); B) Embrião morto (de), e desenvolvimento anormal, denominado embriões teratomórficos ou hidrópicos (te).	34
Figura 8 -	Hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> com diferentes morfologias celulares após exposição ao oxyfluorfen. A) micronúcleo (seta); B) célula binucleada; C) apoptose.	36
Figura 9 -	Grau de danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa em hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> .	37
Figura 10 -	Representação esquemática para realização dos ensaios experimentais.	39
Figura 11 -	Mapa com os pontos de coleta da água do rio Capibaribe, no estado de Pernambuco/Brasil. (P1)	

	Recife; (P2) Salgadinho, (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.	40
Figura 12 -	A) <i>Biomphalaria glabrata</i> pigmentado adulto; B) Cubas de criação dos moluscos.	47
Figura 13 -	Embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> observados em microscópio estereoscópico, no estágio de blástula. Objetiva de 40x.	48
Figura 14 -	A) Coleta de hemolinfa; B) Preparação das lâminas.	51
Figura 15 -	Dissecação parcial do molusco para avaliação da bioacumulação de elementos-traço.	52
Figura 16 -	Quantificação dos elementos-traço analisados no sedimento em suspensão do rio Capibaribe. (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.	59
Figura 17 -	Quantificação dos elementos-traço analisados no sedimento de fundo do rio Capibaribe. (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.	60
Figura 18 -	Toxicidade das amostras da água do rio Capibaribe sobre embriões <i>Biomphalaria glabrata</i> . Onde (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe; (NCL) niclosamida – controle positivo. Resultados significativos em comparação entre as estações ** p <0,01.	61
Figura 19 -	Anormalidades em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos às amostras da água do rio Capibaribe. (A) embrião eclodido do grupo controle negativo. (B) embriões mortos após exposição à amostra de água do	

- ponto 3 e 4. (C) embriões malformados após exposição à água do ponto 3 e 4. (D) desova contendo embriões mortos (1) e embriões em desenvolvimento normal (2). Barra de escala = 600 μm . 62
- Figura 20 - Toxicidade aguda dos moluscos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos às amostras do rio Capibaribe. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadoinho; (P3) Toritama; (P4) Santa Cruz do Capibaribe e (NCL) niclosamida – controle positivo. Resultados significativos em comparação entre as estações *** $p < 0,001$. 64
- Figura 21 - Índice de danos no DNA em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadoinho; (P3) Toritama e (MMS) metanossulfonato de metila – controle positivo. Resultados significativos em comparação entre as estações *** $p < 0,001$. 67
- Figura 22 - Diferentes graus (0 a 4) de danos no DNA (nucleóides) de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos às amostras do rio Capibaribe. Barra de escala = 20 μm . 67
- Figura 23 - Frequência de graus de danos no DNA de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadoinho; (P3) Toritama e (MMS) metanossulfonato de metila – controle positivo. 68
- Figura 24 - Anormalidades encontradas nos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* durante a leitura das lâminas após exposição de amostras do rio Capibaribe (1000x objetiva). (A) Micronúcleo. (B) Binucleação. (C) Hemócito com apoptose e binucleação. Barra de escala = 10 μm . 69
- Figura 25 - Alterações em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após a exposição às amostras do rio Capibaribe. Onde A -

Micronúcleo. B - Binucleação. C - Apoptose. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama. Resultados significativos em comparação entre as estações * $p < 0,05$. 70

Figura 26 - Quantificação dos elementos-traço analisados após exposição dos moluscos *Biomphalaria glabrata* às amostras da água do rio Capibaribe. (P1) Recife; (P2) Salgadinho e (P3) Toritama. 74

Figura 27 - Dendrograma sintetizando o agrupamento dos resultados das análises dos elementos-traço e os bioensaios de acordo com suas semelhanças. (C) Caramujo; (SS) Sedimento em suspensão; (SF) Sedimento de fundo de rio; (AP) Apoptose; (BN) Binucleação; (MN) Micronúcleo. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Limites dos parâmetros físico-químicos e classificação das águas doces em solo brasileiro para uso. CE = Condutividade elétrica. Valores de CE em mS.cm ⁻¹ .	29
Tabela 2 -	Representação do processo de digestão química para análise dos elementos-traço em sedimentos.	43
Tabela 3 -	Classificação para fator de contaminação (FC) e Índice de carga de poluição (PLI).	46
Tabela 4 -	Representação do processo de digestão química para análise dos elementos-traço em moluscos.	53
Tabela 5 -	Parâmetros físico-químicos do rio Capibaribe. CE = condutividade elétrica.	54
Tabela 6 -	Valores do fator de contaminação para os sedimentos em suspensão do rio Capibaribe, e valores de PLI (Índice de carga de poluição). (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.	56
Tabela 7 -	Valores do fator de contaminação para os sedimentos de fundo do rio Capibaribe, e valores de PLI (Índice de carga de poluição). (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	O RIO CAPIBARIBE E SEU ECOSSISTEMA AQUÁTICO	19
2.2	MONITORAÇÃO AMBIENTAL	21
2.3	<i>Biomphalaria glabrata</i>	23
2.4	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	27
2.4.1	Parâmetros físico-químicos	28
2.4.2	Análise química	30
2.4.2.1	Quantificação de elementos-traço em sedimentos e bioindicadores	32
2.4.3	Embriotoxicidade e toxicidade aguda	33
2.4.4	Mutagenicidade e genotoxicidade	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ÁREA DE ESTUDO	39
3.2	COLETAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTOS	40
3.3	ANÁLISE DE ELEMENTOS QUÍMICOS	41
3.3.1	Sedimento em suspensão	41
3.3.2	Sedimento de fundo	42
3.3.3	Processos das análises químicas (sedimentos)	42
3.3.3.1	Tratamento químico das amostras	42
3.3.3.1.1	<i>Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)</i>	43
3.3.3.1.2	<i>Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS)</i>	44

3.3.3.2	Incerteza analítica	44
3.3.3.3	Número E_n – qualidade do procedimento analítico	44
3.3.3.4	Fator de contaminação (FC) e Índice de carga de poluição (PLI)	45
3.4	BIOENSAIOS	46
3.4.1	Criação e manutenção do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	47
3.4.2	Embriotoxicidade	47
3.4.3	Toxicidade aguda	48
3.4.4	Viabilidade de hemócitos	49
3.4.5	Genotoxicidade: Ensaio cometa	50
3.4.6	Ensaio de citotoxicidade em hemócitos de <i>B. glabrata</i>	50
3.4.7	Bioacumulação em moluscos (tecido mole)	51
3.4.7.1	Análise química dos moluscos	52
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	54
4.2	ANÁLISES QUÍMICAS DOS SEDIMENTOS	55
4.2.1	Fator de contaminação (FC) e Índice de carga de poluição (PLI)	56
4.2.2	Caracterização química	57
4.3	BIOENSAIOS	60
4.3.1	Embriotoxicidade	61
4.3.2	Toxicidade aguda	63
4.3.3	Genotoxicidade: ensaio cometa	66

4.3.4	Citotoxicidade em hémocitos de <i>B. glabrata</i>	69
4.3.5	Bioacumulação de elementos-traço	72
4.4	ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS	74
5	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A - VALORES DE REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

O despejo exacerbado de substâncias químicas advindas de efluentes industriais, domésticos ou agropecuários em rios, ocasiona mudanças na água em seu estado físico-químico e biológico, desencadeando conseqüentemente danos aos organismos aquáticos presentes nesse meio (BELTRAME et al., 2016; CAMARGO et al., 2016). A Bacia Hidrográfica do rio Capibaribe é uma das principais do Estado de Pernambuco, nascendo na divisa dos Municípios de Jataúba e Poção, percorrendo do agreste até a Região Metropolitana do Recife (RMR) (APAC, 2021).

Em todo o seu percurso, há impactos ambientais devido à existência de indústrias (têxtil, alumínio, plástico, etc.) e alta concentração de residências sem planejamento sanitário adequado, contribuindo com inclusão excessiva de vários tipos de contaminantes como elementos químicos e produtos de tingimento de tecidos durante seu trajeto (MISHRA; CHOWDHARY; BHARAGAVA, 2019; SILVA, 2019). A avaliação dos impactos sofridos durante o percurso do rio Capibaribe, propicia uma melhor monitoração do ambiente aquático das regiões pelas quais ele percorre. Portanto a utilização e padronização de organismo-modelo para testes de toxicidade aquática de baixo custo e com resultados rápidos e eficientes, poderá contribuir para um desenvolvimento regional sustentável.

A avaliação da qualidade de ambientes aquáticos, muitas vezes é realizada por meio de análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água (PIRATOBA et al., 2017; SCALIZE et al., 2021), deixando uma lacuna em relação aos impactos sobre organismos vivos e avaliação dos sedimentos em suspensão e de fundo presentes nesses ecossistemas e sua contribuição sobre a toxicidade ambiental. Os sedimentos podem ser ricos em compostos orgânicos e elementos-traço, que são elementos presentes em baixas concentrações nos ecossistemas, em níveis de parte por milhão (ppm), podendo ser tóxicos, como chumbo (Pb) e cádmio (Cd) ou biologicamente essenciais como ferro (Fe) e zinco (Zn) (LOUREIRO; HEPP, 2020), sendo transportados ou depositados nas margens dos rios, favorecendo a absorção desses elementos pelas espécies desse habitat (ZHUANG et al., 2019; MIAO et al., 2021) portanto, avaliá-los passou a ser importante para estudos de impacto ambiental.

Os grupos de animais normalmente utilizados como bioindicadores são os peixes e anfíbios, porém sabe-se que esses ecossistemas são formados por

aproximadamente 90% de invertebrados, dentre os quais destacam-se os moluscos com maior frequência (CONCEIÇÃO, 2019). Portanto, torna-se fundamental a utilização de invertebrados aquáticos como ferramenta de gestão para monitorar possíveis mudanças nesse ecossistema.

Dentre os invertebrados aquáticos, o molusco *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) vem sendo utilizado como indicador ambiental tanto para agentes físicos (CANTINHA et al., 2010; SILVA et al., 2018), quanto agentes químicos (LIMA et al., 2019b; SIQUEIRA et al., 2020); dadas a ampla distribuição geográfica, o curto ciclo de vida, a fácil coleta e manutenção em condições laboratoriais e a reprodução durante o ano inteiro (TALLARICO; MIYASATO; NAKANO, 2016; LIMA et al., 2019b).

Sabe-se que os seres vivos inseridos em ambientes poluídos por substâncias químicas tendem a acumular tais elementos em seu organismo como reflexo da disponibilidade de substâncias químicas em sedimentos, água ou atmosfera. Além disso, seus aspectos populacionais qualitativos e quantitativos são influenciados por mudanças nas condições ambientais (BOUR et al., 2015; VAN DEN BRINK et al., 2019).

Baseado nestas informações enfatiza-se a importância de avaliar a toxicidade, genotoxicidade e quantificar a concentração de elementos químicos nos recursos hídricos da Bacia do rio Capibaribe, bem como padronizar um novo modelo experimental de baixo custo, fácil desenvolvimento e alta sensibilidade para indicação da qualidade ambiental no meio aquático.

Portanto, este trabalho tem como objetivo geral analisar os efeitos ecotoxicológicos das águas superficiais e dos sedimentos em suspensão e de fundo da bacia hidrográfica do rio Capibaribe, utilizando como organismo-modelo a espécie de invertebrados: *Biomphalaria glabrata*. Como objetivos específicos temos:

- Analisar a composição físico-química da água em amostras da água do rio Capibaribe;
- Analisar a composição química presente no sedimento em suspensão e sedimento de fundo em amostras do rio Capibaribe;
- Estudar a embriotoxicidade da água sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*;

- Avaliar a toxicidade das águas do rio Capibaribe sobre os moluscos adultos da espécie *B. glabrata*;
- Verificar a citotoxicidade e genotoxicidade das amostras da água do rio Capibaribe sobre o molusco *B. glabrata*;
- Identificar a bioacumulação de elementos químicos presentes nos tecidos do *B. glabrata* expostos às amostras da água do rio;
- Relacionar os efeitos biológicos apresentados nos bioensaios com a presença dos elementos químicos presentes nos sedimentos e amostras de água do rio Capibaribe.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Ecotoxicologia, é a ciência que examina os movimentos de substâncias nocivas e poluentes químicos no ambiente, incluindo migração, transformação e degradação, integrando assim, a toxicologia e a ecologia (ZHOU et al., 2019). Atualmente faz parte da ecotoxicologia estudar a presença de elementos-traço em diferentes matrizes ambientais. Estes elementos podem causar os mais variados efeitos tóxicos aos organismos presentes nos diferentes ecossistemas, como alteração na reprodução, desenvolvimento e crescimento dos indivíduos, modificação no comportamento habitual de cada espécie, acarretando assim um desequilíbrio ecológico (JADHAV et al., 2010; MISHRA et al., 2019). Portanto, incluir estudos com organismos-modelo para avaliar as condições ambientais tornou-se essencial para nossa sociedade. Dentre os diferentes ecossistemas, pode-se destacar o ambiente aquático, que é o local preferido de descartes das indústrias, agricultura e resíduos domésticos.

2.1 O RIO CAPIBARIBE E SEU ECOSSISTEMA AQUÁTICO

O território brasileiro abrange em média 12% de toda a água doce do planeta, ou seja, possui um enorme potencial hídrico, capaz de prover um volume de água por pessoa 19 vezes superior ao mínimo estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) – cerca de 1.700 m³/s por habitante por ano (MMA, 2021). No estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, encontra-se o rio Capibaribe que faz parte de uma das principais bacias hidrográficas desse estado (Figura 1).

O rio Capibaribe, nasce na divisa dos municípios de Jataúba e Poção, percorre uma extensão de aproximadamente 280 km até sua foz, na cidade do Recife, capital do Estado (APAC, 2021).

Apresenta direção inicial sudeste-nordeste, até as proximidades de Santa Cruz do Capibaribe, percorrendo diversas comunidades e centros urbanos, servindo muitas vezes de depósito de resíduos industriais e domésticos, até seu curso tomar a direção oeste-leste, em direção à cidade do Recife, para desembocar no Oceano Atlântico (APAC, 2021).

podendo ser acumulados nos solos ou transportados em partículas suspensas pelos rios. Após a agricultura, as indústrias têxteis são as maiores poluidoras de água limpa no mundo (HUSSAIN; WAHAB, 2018).

A maior parte dos organismos existentes no ecossistema aquático é de invertebrados, e eles são comumente expostos à diversas substâncias químicas, como os metais essenciais ou não essenciais. Os metais essenciais são elementos químicos que auxiliam em diferentes papéis nos organismos vivos, como na manutenção da homeostase metabólica, alguns metais essenciais são cálcio (Ca) e ferro (Fe) (LV et al., 2021). Os não-essenciais, em geral, são tóxicos para os organismos, como por exemplo, chumbo (Pb) e cádmio (Cd), e, dependendo da concentração em que se encontram, podem danificar as membranas celulares e aumentar a presença de espécies reativas de oxigênio (YAO et al., 2020). A bioacumulação dos mesmos pode desencadear uma série de efeitos nocivos ao longo do tempo, provocando mudanças no ecossistema aquático (STEPHANSEN et al., 2016; YAO et al., 2020).

Levando em consideração a importância de acompanhar os danos sofridos nesse ambiente, diferentes organismos-modelo têm sido utilizados na avaliação da qualidade da água de mananciais aquáticos por companhias de abastecimento hídrico em diferentes cidades da região nordeste (OLIVEIRA, 2017; OLIVEIRA, 2019).

2.2 MONITORAÇÃO AMBIENTAL

O desequilíbrio ambiental está relacionado a qualquer modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, podendo ser resultado da atividade humana desenfreada e que perturbe a saúde, o bem-estar da população, as atividades econômicas, a biota e a qualidade dos recursos ambientais (MASINDI; MUEDI, 2018).

Os rejeitos, quando depositados de forma incorreta nas águas superficiais dos rios, podem formar uma espuma em sua superfície. Isso tende a transformar a coloração natural da água, diminuindo a quantidade de luz solar para organismos fotossintetizantes e a fração de oxigênio dissolvido na água. Isso tudo modifica as propriedades físicas dos cursos d'água e, como consequência, resulta em efeitos

tóxicos para os organismos que ali habitam (MEIRELES, 2013; MISHRA; CHOWDHARY; BHARAGAVA, 2019; SILVA, 2019). Uma forma de controlar tais efeitos seria implementar técnicas de monitoração ambiental.

A biomonitoração ambiental compreende o princípio em que os organismos são os indicadores da saúde do ambiente em que estão inseridos (USEPA, 2002). Por meio da utilização de espécies bioindicadoras e biomonitoras, é possível avaliar as alterações ambientais de forma mais eficiente, do que por meio de medidas instantâneas que adotem exclusivamente parâmetros físico-químicos, como aferição de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, teores totais e dissolvidos de nutrientes (BIRK et al., 2012; MEHARI et al., 2014).

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas, cuja presença, quantidade e distribuição contêm uma série de informações sobre a qualidade e magnitude dos impactos ambientais em um ecossistema (GALLOWAY, 2006; MARKERT, 2008). Os biomarcadores consistem em moléculas mensuráveis, celulares, teciduais, alterações corporais, fisiológicas ou bioquímicas nos indivíduos expostos a agentes tóxicos (ZHOU et al., 2019).

Modelos de bioindicadores devem apresentar características como: abundância no ecossistema, curto ciclo de vida, fácil identificação e fácil amostragem, sensibilidade aos diferentes impactos de forma gradual e possibilidade de uso em estudos ecotoxicológicos (PINILLA-CORTÉS; MORENO-GUTIÉRREZ, 2019). A espécie bioindicadora reflete qualitativamente a “saúde” do ecossistema, e para isto podem ser usados organismos vertebrados e invertebrados (HALL; RHIND; WILSON, 2009; FABRIN et al., 2018). A resposta desses sistemas pode ser mensurada por meio da análise das células, órgãos, tecidos ou fluidos corporais (ŁUCZYŃSKA; PASZCZYK; ŁUCZYŃSKI, 2018).

A capacidade de algumas espécies em acumular compostos tóxicos em seus tecidos tem sido utilizada como instrumento na monitoração ambiental, correlacionando com a sua concentração no meio ambiente (POLECHOŃSKA et al., 2018). Eles podem se bioacumularem em pequenas ou em altas concentrações nos tecidos e órgãos dos peixes e demais animais invertebrados aquáticos, podendo ou não ser excretados ou sofrerem detoxificação (KHAN; BURY; HOGSTRAND, 2012).

Portanto, estudos com os invertebrados estão tomando grande espaço na ecotoxicologia, objetivando substituir a utilização de animais vertebrados, particularmente mamíferos, por questões bioéticas, redução de custo e espaço

necessários para a realização dos bioensaios (HABIB et al., 2016; ALVES; NIEMEYER; CARDOSO, 2017). Entre bioindicadores invertebrados, encontramos caramujos de água doce como o *Biomphalaria glabrata* (LIMA et al., 2019a; 2019b).

2.3 *Biomphalaria glabrata*

A espécie *B. glabrata* pertence ao reino Animalia, filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae e gênero *Biomphalaria*. Habita coleções de água doce e com temperatura em torno de 20 a 26 °C, pH neutro (6,8 a 7,8), boa insolação, ricas em matéria orgânica e vegetação enraizada ou flutuante (REY, 2015; NEVES et al., 2016).

O molusco *B. glabrata* (Figura 2) é hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansoni, doença endêmica que acomete o Brasil (CARVALHO et al., 2018). A distribuição geográfica do molusco ocorre principalmente em 16 estados brasileiros, nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste. O estado de Pernambuco é endêmico para a doença, com foco em 101 municípios, sendo a Zona da Mata a região mais atingida e principalmente áreas rurais, porém a falta de saneamento básico em regiões urbanas tem apresentados casos agudos na Ilha de Itamaracá e cronicidade da doença e na Praia de Porto de Galinhas (SES, 2012; CARVALHO et al., 2020).

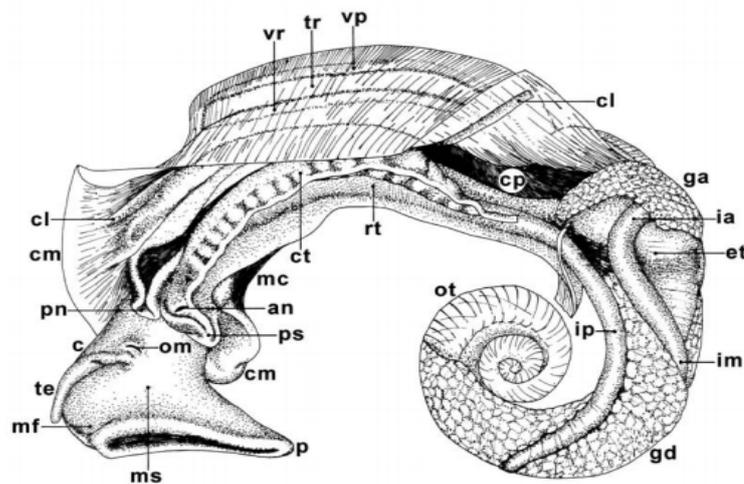
Esses invertebrados de água doce possuem ciclo de vida de aproximadamente um ano, atingindo a maturidade sexual por volta de dois meses de vida, quando conseguem ovipor desovas plúrioovuladas (NEVES et al., 2016). Os caramujos adultos desta espécie apresentam um diâmetro de concha que varia de 10 a 40 mm, são mineralizadas com presença de 95% de carbonato de cálcio. Esta estrutura possui a função de proteção e abrigo do corpo do molusco, envolvendo as vísceras (Figura 3) (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008). Possui cor natural amarelo-palha, porém quando em presença de substâncias corantes dissolvidas na água, podem se modificar e chegar a marrom e até mesmo o negro, quando na presença do óxido de ferro (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008; REY, 2008; CANTINHA, 2012).

Figura 2 - Moluscos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: A autora (2021).

Figura 3 - Esquema de um animal do gênero *Biomphalaria* retirado da concha, com a indicação de seus órgãos internos.



Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).

Fonte: Adaptada de Carvalho et al. (2014).

Segundo Rey (2015), os alimentos fornecem sais de cálcio para a síntese das conchas, sendo depositados no hepatopâncreas, como fosfatos e, posteriormente,

transportados através da hemolinfa até o manto, onde são convertidos em carbonatos por meio da atuação das fosfatases.

O trato digestivo de *B. glabrata* é constituído de uma boca, cavidade bucal, esôfago, estômago, intestino, reto e ânus (FRANSOZO; NEGREIROS-FRANSOZO, 2016). Possui espessamentos cuticulares denominadas mandíbulas e rádula, um órgão de alimentação altamente desenvolvido, que corta os alimentos (CANTINHA, 2008; REY, 2015). A digestão extracelular ocorre no estômago, e o intestino estende-se da extremidade anterior do estômago através da massa visceral, para se abrir via ânus, que tem por função a formação, compactação e armazenamento das fezes (MOORE, 2003; FRANSOZO; NEGREIROS-FRANSOZO, 2016).

O sistema circulatório de *B. glabrata* é constituído pelo coração que tem duas cavidades: o ventrículo e a aurícula. A hemolinfa (sangue do molusco) é composta de elementos amebóides (hemócitos), cloreto de sódio, plasma rico em água, bicarbonatos e hemoglobina contendo ferro dissolvido, facilitando a utilização do oxigênio à baixa tensão (PESSÔA; MARTINS, 2011; REY, 2015). Como o sistema circulatório é aberto, a hemolinfa deixa os vasos circulatórios e banha os tecidos. Posteriormente, ela é drenada pelos vasos e retorna ao coração (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008).

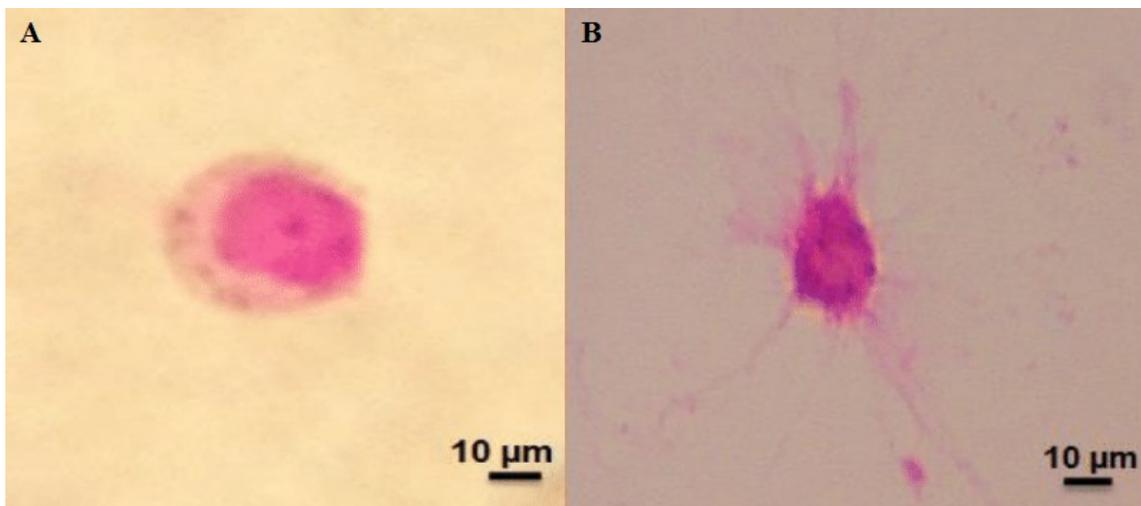
Os moluscos *B. glabrata* possuem uma estrutura considerada como o órgão principal para hematopoiese, que fica localizada na região entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, este órgão seria o responsável pela produção de células circulantes, denominadas de hemócitos ou amebócitos. Após a formação dessas células, elas podem ser encontradas tanto na hemolinfa quanto nos espaços intersticiais (SALAMAT; SULLIVAN, 2009; PILA et al., 2016).

As células hemocitárias apresentam um papel importante no sistema de defesa, realizando atividades fagocitárias, encapsulação e transporte de cálcio no reparo tecidual (PILA et al., 2016). Alguns autores indicam a existência de dois tipos celulares (Figura 4): os granulócitos possuem a capacidade de formar muitos pseudópodes, têm em média 7-16 µm de diâmetro, tem similaridade aparente com macrófagos dos animais vertebrados, são responsáveis pela fagocitose e a imobilização de parasitas por encapsulamento. Os grânulos basofílicos distribuídos no citoplasma dessas células, são conhecidos como lisossomos, constituem cerca de 87% da população de hemócitos (CAVALCANTI et al., 2012; PILA et al., 2016). Outro tipo de células são os hialinócitos, menores que os granulócitos (5-8 µm de

diâmetro), e apresentam contorno circular quando em contato com superfícies, apresentam também núcleo em posição central, pouca tendência para formar pseudópodes e quase nenhuma estrutura lisossômica, fazem parte em média de 13% da população hemocitária (CAVALCANTI et al., 2012; PILA et al., 2016; LIMA, 2017).

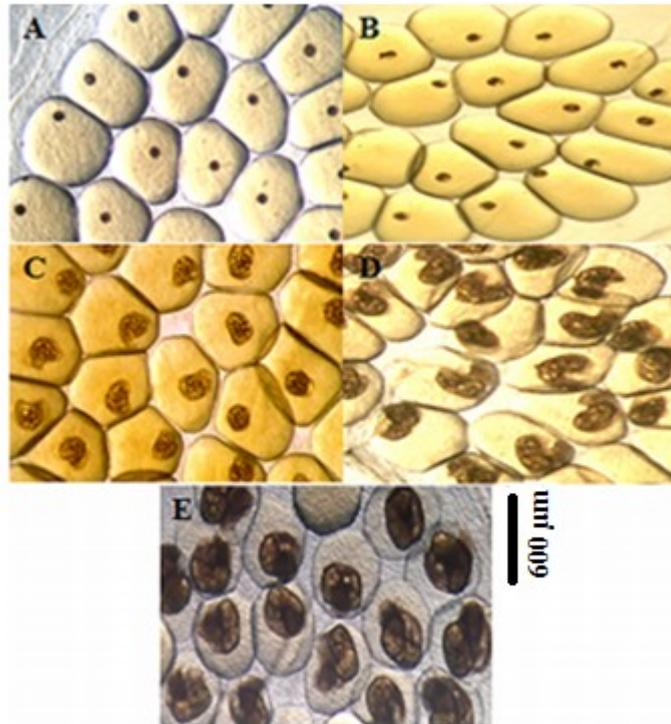
Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas, podendo realizar a autofecundação ou a fecundação cruzada, em menos de 3 meses 10 milhões de descendentes podem surgir de uma única espécie (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008; CANTINHA, 2008; PILA; PECK; HANINGTON, 2017). Além disso, essas características favorecem a rápida reprodução desses animais no ambiente. Fator interessante para um bioindicador. O número de embriões em uma desova depende de fatores biológicos e ambientais, os quais influenciam a fecundidade e viabilidade dos ovos (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008). A maturação do ovo acontece independentemente da fertilização e continua até a metáfase da primeira divisão meiótica de maturação. Permanece neste estágio até a penetração do espermatozóide, e caso os ovos não sejam fertilizados, ficam bloqueados nesse estágio. Após a oviposição da desova, o ovo maduro em torno de 100 μm de diâmetro (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008). Além disso, os estádios embrionários (Figura 5) dos moluscos, em geral, demonstra alta sensibilidade para uma vasta gama de poluentes (ARAÚJO et al., 2018; LIMA et al., 2019a; SIQUEIRA et al., 2020; 2021).

Figura 4 - Células da hemolinfa (aumento de 1000x). A) hialinócito; B) granulócito.



Fonte: Lima (2017).

Figura 5 - Estágios embrionários do *Biomphalaria glabrata*. A) blástula; B) gástrula; C) trocófora; D) véliger e E) hippo stage.



Fonte: Araújo et al. (2018).

Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar os efeitos tóxicos de substâncias químicas em *B. glabrata*, como testes de mortalidade (ou taxa de sobrevivência dos moluscos diante da substância testada), a avaliação proteica, danos ao DNA, atividade e inibição enzimática, além do acompanhamento do desenvolvimento no período embrionário (KRISTOFF et al., 2012; SILVA et al., 2013; LIMA et al., 2019b; SIQUEIRA et al., 2021).

2.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os testes de ecotoxicidade evidenciam os efeitos colaterais de uma substância tóxica aos níveis de alteração nos processos metabólicos, modificações na morfologia e comportamento dos organismos expostos (HABIB et al., 2016; ZHOU et al., 2019). As concentrações de efeitos letais são os indicadores mais comuns para avaliar quantitativamente os riscos para espécies expostas a contaminantes, e podem ser medidos através do meio à qual ocorre a exposição (água, alimentos, ar e sedimentos) e/ou pelas concentrações em que ocorrem essa exposição (ZHOU et al., 2019). Por isso, é necessária a utilização de organismos de

fácil manuseio para detectar os níveis de degradação dos recursos naturais, como a água, de forma rápida e simples.

2.4.1 Parâmetros físico-químicos

As características físico-químicas da água são de extrema importância para os ecossistemas aquáticos, pois influenciam o desenvolvimento, sobrevivência e adaptação dos diferentes organismos presentes nesse ambiente (MEDEIROS-SOUSA et al., 2020). A qualidade da água é avaliada através de três indicadores: físicos, químicos e biológicos. Essa qualidade pode variar de acordo com localização geográfica, estação, atividades humanas e a presença de fontes de poluição (HALDAR et al., 2020).

Segundo Souza et al. (2012) dentre os parâmetros analisados, estão:

1. pH - potencial hidrogeniônico, mensuração dos íons H^+ que estão presentes em uma solução. A escala do pH varia de 0 a 14, onde valores entre 0-6 indicam acidez, valores na faixa de 7 indicam neutralidade, e valores que variam entre 8-14 indicam a alcalinidade da solução. O pH de rios, por exemplo, pode ser originário de fontes naturais do ambiente em que se encontra o rio, ou consequência de agentes poluidores na água.
2. Condutividade elétrica (CE) - parâmetro que é proporcional à concentração de íons de sais dissolvidos e ionizantes presentes no ambiente aquático com capacidade de conduzir corrente elétrica. Pode indicar mudanças químicas do rio devido às chuvas, mudança de temperatura, erupções, etc. (MCCLESKEY et al., 2012).

A resolução n° 357/2005 do CONAMA que regula o uso de águas doces para diversos fins, inclusive para irrigação determina que os valores do pH devem variar entre 6,0 e 9,0. A legislação nacional não define padrões para condutividade elétrica em corpos d'água, mas de acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) valores de CE acima de $0,1 \text{ mS.cm}^{-1}$ são indicativos de ambiente impactado (ARAÚJO et al., 2015). Além disso, o pH e a condutividade podem influenciar a biodisponibilidade dos elementos-traço alterando sua absorção pela via de ingestão alimentar dos organismos que vivem e/ou utilizam as águas desse ecossistema (LIMA, 2013).

Araújo et al. (2015) avaliaram a qualidade da água utilizada para irrigação na bacia do Córrego Sujo – Rio de Janeiro, e os valores médios de pH apresentaram-se ácidos, entre 6,0 e 7,0, possivelmente devido à entrada de matéria orgânica e efluentes domésticos, pois algumas das estações estudadas ficavam próximas a residências, porém por estarem dentro dos valores recomendado pela resolução CONAMA 357, não causa danos ao homem ou a vida aquática. Avaliando parâmetros físico-químicos da água e sedimento do lago Bonsucesso, Jataí – Goiás, Martins, Brait e Santos (2017) observaram o valor de CE na estação chuvosa superior ao valor encontrado na estação seca (0,03 e 0,02 mS.cm⁻¹, respectivamente), enquadrando-se na classe Especial, segundo a classificação do CONAMA 357/2005 (Tabela 1). Fato atribuído ao processo de carreamento de partículas iônicas contidas nos sedimentos em período de chuva.

Tabela 1 - Limites dos parâmetros físico-químicos e classificação das águas doces em solo brasileiro para uso. CE = Condutividade elétrica. Valores de CE em mS.cm⁻¹.

Classes	Limites para enquadramento	Principais usos
Especial	pH 6,0 a 9,0 CE até 0,05	Consumo humano com desinfecção; Preservação dos ambientes aquáticos e das comunidades aquáticas.
I	pH 6,0 a 9,0 CE até 0,05 até 0,08	Consumo humano, após tratamento simplificado; Recreação (natação, mergulho); Irrigação de hortaliças; Proteção em Terras Indígenas.
II	pH 6,0 a 9,0 CE até 0,08 até 0,1	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; Parques que o público possa ter contato direto; Atividade de pesca.
III	pH 6,0 a 9,0 CE até 0,1 até 0,15	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; Pesca amadora; Para consumo pelos animais.
IV	pH 6,0 a 9,0 CE + 0,15	Navegação e à harmonia paisagística.

Fonte: Adaptada da Resolução do CONAMA no. 357/2005.

As análises físico-químicas embora revelem uma “condição debilitada” na qual o ecossistema se encontra, por si só elas não são suficientes para detectar modificações mais profundas, necessitando de técnicas de monitoração mais complexas, como análises de elementos químicos e os testes biológicos.

2.4.2 Análise química

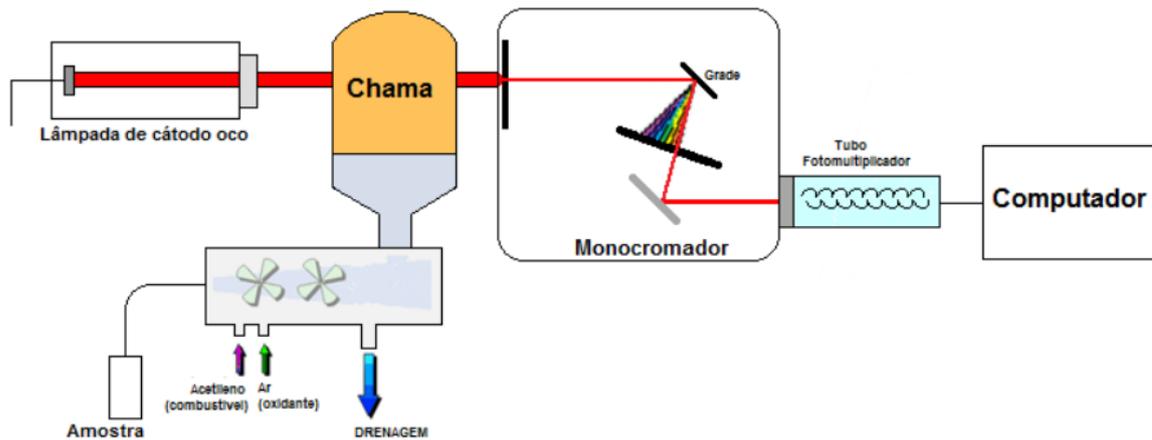
Técnicas analíticas possibilitam a quantificação dos elementos químicos fornecendo informações relevantes para estudos de monitoração ambiental. Alguns elementos destacam-se por serem essenciais aos seres vivos, como ferro (Fe), zinco (Zn), cálcio (Ca), cobre (Cu) e etc. Porém quando estes elementos apresentam-se em quantidades elevadas podem causar sérios problemas aos seres vivos como: inibir a ação de enzimas, alterar as funções e estruturas de organelas celulares, perturbar os processos metabólicos e fisiológicos. Além disso, existem os elementos não-essenciais que mesmo em quantidades baixas afetam drasticamente a vida dos organismos, por exemplo, chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e arsênio (As) (STEPHANSEN et al., 2016; YAO et al., 2020).

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), técnica analítica, tem sido bastante utilizada em pesquisas ambientais para determinar a composição elementar de amostras em matrizes geológicas e biológicas (CARTER et al., 2013; THOLKAPPIAN et al., 2018). O princípio da técnica de AAS consiste em determinar a presença e concentração de elementos metálicos em uma solução, baseando-se na propriedade em que os átomos livres absorvem energia através de uma fonte de radiação e em um dado comprimento de onda quando estão em seu estado fundamental. Posteriormente, os átomos sofrem relaxação e o elétron volta para o nível de energia mais estável, devolvendo a energia ganha em forma de calor ou luz. Isso ocorre através do sistema de atomização, uma das etapas mais importantes da AAS, e os principais atomizadores utilizados atualmente são o de chama (Absorção Atômica de Chama – FAAS) e o forno de grafite (Absorção Atômica em Forno de Grafite – GFAAS) (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004; MÉLO, 2014).

A técnica de FAAS é empregada para a análises de elementos químicos presentes nas amostras em níveis da ordem de mg kg^{-1} (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004;). A amostra é aspirada do seu recipiente ($4 \text{ a } 7 \text{ mL min}^{-1}$) e nebulizada na forma de um aerossol (gotículas dispersas em gás) em uma câmara de nebulização, esses aerossóis entram em contato com a chama (geralmente o gás acetileno), que tem a função de transformar os íons em átomos no estado fundamental (processo de atomização), e através de um monocromador a luz é dispersa e é selecionado o comprimento de onda a ser utilizado, uma válvula

fotomultiplicadora (detector) transforma a energia não absorvida em um sinal elétrico, onde é possível medir a intensidade da luz. Após o processamento do sinal é registrado a leitura (Figura 6) (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004).

Figura 6 - Funcionamento do espectrômetro de absorção atômica (modelo de chamas - FAAS).



Fonte: Mélo (2014).

A técnica de GFAAS se destaca em relação a FAAS por determinar as concentrações dos elementos na escala de $\mu\text{g kg}^{-1}$ (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004), apresentando-se assim altamente sensível. Além disso, essa técnica utiliza pequenos volumes de amostra (10 a 100 μL). O GFAAS resume-se em um tubo de cilindro oco de grafite, de $\sim 0,5$ cm de diâmetro, onde uma micropipeta injeta a amostra no orifício central. Um gás inerte (geralmente o argônio) vai até a parte central do sistema evitando que haja entrada de ar, e eliminando os vapores que são gerados pela amostra. O tubo de grafite é aquecido a uma alta temperatura, permitindo que o analito sofra uma atomização. Os átomos vaporizados absorvem a radiação que atravessa o tubo e a intensidade da radiação transmitida é então mensurada (BORGES, 2016).

Outras etapas muito importantes nessa técnica são a limpeza e o resfriamento após a leitura da amostra, na primeira aplica-se uma temperatura mais elevada que no processo de atomização, em torno de 2-3 segundos, isso evita uma possível memória entre as amostras, já a segunda geralmente é feita automaticamente na maioria dos equipamentos, a temperatura do forno fica próxima à temperatura ambiente para que seja possível receber a próxima amostra (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2007; BORGES, 2016).

2.4.2.1 Quantificação de elementos-traço em sedimentos e bioindicadores

Segundo a resolução n° 454/2012 do CONAMA as concentrações de metais e semimetais em água doce (mg kg^{-1} – material seco) são divididas em dois níveis (1 e 2): Nível 1- limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota; Nível 2 - limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota. Estima-se que 99% das substâncias que atingem o sistema aquático, inclusive os elementos-traço, interagem por meio das propriedades físico-químicas do ambiente e fixam-se nos sedimentos, afetando não só a qualidade da água, como também a bioacumulação nas espécies e a transferência na cadeia trófica (MARTINS; BRAIT; SANTOS, 2017).

Lyra (2016) observou concentrações elevadas de zinco (Zn) e manganês (Mn), em torno de 318 mg kg^{-1} e 676 mg kg^{-1} , respectivamente, em amostras de sedimento em suspensão do rio Beberibe. O Mn é considerado como um dos principais indicadores de impacto antropogênico em sedimentos em suspensão de rios (VIERS; DUPRÉ; GAILLARDET, 2009).

Segundo Sanyal, Kaviraj e Saha (2015), sedimentos das águas do rio Churni, na Índia, apresentaram elevadas concentrações de cromo (Cr), devido ao recebimento regular de efluentes das fábricas de corantes associadas às indústrias têxteis. Os autores também observaram que no período de verão, há concentrações altas de Cr em animais invertebrados como o molusco aquático *Pila globosa*, por meio da análise do hepatopâncreas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AAS), que chegou a identificar $5,75 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cr. No entanto, sabe-se que além do elemento químico cromo, o chumbo e o cobre também são largamente utilizados para a produção de pigmentos de corantes têxteis (DEEPALI; GANGWAR, 2010).

O efeito tóxico nos órgãos e sistemas é outro tema importante na ecotoxicologia. Alguns órgãos ou sistemas são mais propensos às substâncias tóxicas devido ao seu contato próximo com o meio ambiente, localização em relação à circulação sanguínea ou função específica (RAINBOW, 2002; PETER et al., 2018). Eles podem ser alvos diretos de efeitos tóxicos (brânquias e fígado) ou podem ser rotas de entrada (órgãos respiratórios e trato digestivo), alterando as trocas normais de íons e gases e o desenvolvimento normal do organismo. Estudos que envolvem organismos inteiros enfatizam a bioacumulação, o acúmulo líquido de contaminantes

em água, ar ou fases sólidas do seu ambiente (SANYAL; KAVIRAJ; SAHA, 2015; ZHOU et al., 2019).

Um estudo com moluscos da espécie *Littoraria angulifera*, coletados do manguezal do Espaço Ciência (Pernambuco), realizado por Santos (2016), apresentou resultados médios de concentração de cobre (Cu) de 390 mg kg^{-1} , utilizando a técnica de FAAS, nas glândulas digestivas dos animais, o que provavelmente está relacionado com o impacto antropogênico. Esses moluscos destacam-se pela capacidade de concentrar Cu em suas glândulas digestivas, o que pode estar relacionado à mutagenicidade e às alterações histológicas, fundamentando a pressão ambiental sofrida por *L. angulifera* no local estudado.

A glândula digestiva dos gastrópodes é um órgão bioacumulador de íons metálicos presentes no ambiente (NICA et al., 2017). Em estudos anteriores, Rocha et al. (2015) observaram que o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* quando exposto a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio solúvel (Cd^{2+}) por um período de 3 dias acumularam Cd^{2+} na glândula digestiva em maior quantidade quando comparado a outros órgãos e tecidos. Os íons de Cd^{2+} competem pelos sítios de ligação de Ca^{2+} (cálcio) nas células, alterando a homeostase do cálcio, o que pode causar efeitos deletérios na função do sistema nervoso central (SNC) e levar à morte do organismo (LIMA, 2017).

2.4.3 Embriotoxicidade e toxicidade aguda

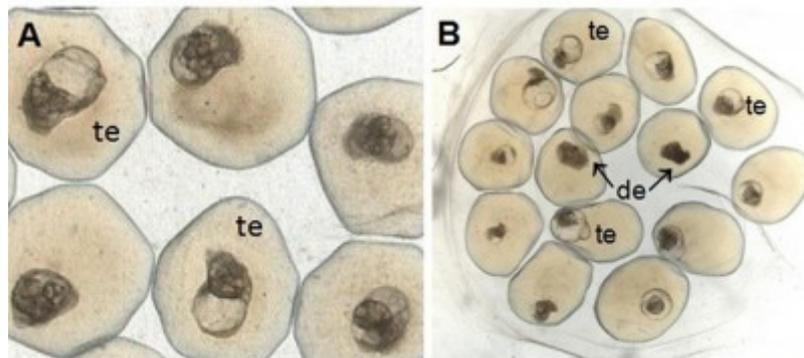
A necessidade de avaliar os potenciais riscos sub-letais em baixas concentrações de poluentes para os ecossistemas, tem estimulado os programas de monitoração ambiental a analisar os efeitos sobre os gametas, a fertilização, a reprodução e o desenvolvimento embrio-larval de organismos que habitam esse ecossistema (LLANOS-RIVERA et al., 2009). Além disso, entre as inúmeras substâncias químicas que atingem o meio ambiente, algumas classes de compostos como os elementos-traço podem afetar diretamente os organismos através da indução de mutações em células germinativas (TALLARICO et al., 2014). Elementos-traço advindos de produtos industriais passam a se movimentar em águas pluviais do ambiente aquático, onde prejudicam os organismos, causando

efeitos sub-letais no desenvolvimento embrionário, no metabolismo, na reprodução, no comportamento, na fisiologia e na bioenergética (SONNACK et al., 2018).

Malformações no desenvolvimento embrionário e mortalidade são utilizadas como biomarcadores em testes de mutagenicidade, uma vez que são resultantes da indução de mutações nas células germinativas (tetarogênicos) (NAKANO et al., 2003). Os testes de toxicidade aguda são caracterizados pela curta duração da exposição, onde a letalidade (resposta severa e rápida) e a imobilização dos organismos jovens são os efeitos mais avaliados (FIGUEIREDO, 2011).

Tallarico et al. (2014) constataram que embriões de *B. glabrata* expostos ao elemento cromo apresentaram malformações teratomórficas após a exposição de 24h, onde os embriões no estágio de Véliger (120 h após a primeira clivagem) foram 17 vezes mais sensíveis ao cromo do que os animais adultos (Figura 7). Elementos químicos em excesso podem ser bastante prejudiciais aos organismos, como o cobre - um moluscicida bem conhecido, níquel, chumbo e cádmio que durante a exposição podem ocasionar sofrimento ou morte aos animais (AZAMAN et al., 2015; HABIB et al., 2016).

Figura 7 - A) Embriões de *Biomphalaria glabrata* em exposição de 24 h, observados diariamente durante 8 dias, expostos ao cromo ($K_2Cr_2O_7$); B) Embrião morto (de), e desenvolvimento anormal, denominado embriões teratomórficos ou hidrópicos (te).



Fonte: Adaptada de Tallarico et al. (2014).

2.4.4 Mutagenicidade e genotoxicidade

Organismos aquáticos são excelentes indicadores de genotoxicidade. A partir de uma única gota de hemolinfa, é possível visualizar milhares de células (BARŠIENĖ et al., 2015). Devido ao baixo custo e rápido desempenho dos animais

invertebrados, as células do sistema de defesa, os hemócitos, tornaram-se uma das células com maior potencial para o trabalho de biomarcadores. Algumas mudanças observadas nos hemócitos refletem a falha de uma célula em permanecer viável na presença de substâncias tóxicas e/ou de tentativas parcialmente bem-sucedidas de manter a homeostase (ZHOU et al., 2019). Assim, tais métodos fornecem excelentes alternativas para o diagnóstico de aberrações cromossômicas ou mesmo para detecção de micronúcleos (MNs).

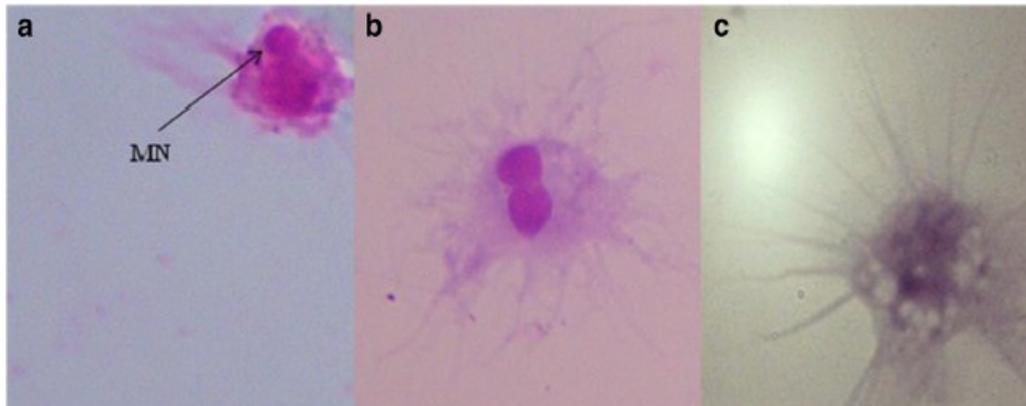
O teste do micronúcleo é utilizado para pesquisar o impacto de xenobióticos baseado em seus danos em fragmentos de cromossomos, ou cromossomos inteiros, que ocorrem durante o processo de divisão celular. Os MNs podem ser originários da falha do fuso mitótico (clastogênese) e desenvolvimento de membranas contendo fragmentos de DNA que representam quebra ou danos cromossômicos (aneugênese) (SILVA, 2019; MORAIS, 2020). Os MNs se originam depois que o organismo é exposto a agentes tóxicos presentes no ecossistema, portanto, o teste de micronúcleo é amplamente utilizado em práticas de biomonitoramento, uma vez que tem alta capacidade de detectar danos citogenéticos induzidos por agentes mutagênicos (DEUTSCHMANN et al., 2016; MORAIS et al., 2016).

Moluscos adultos da espécie *B. glabrata* expostos a agentes genotóxicos, como o oxyfluorfen, demonstraram, após 48 h de exposição, um comportamento dose-dependente em relação ao surgimento de MNs, entre outras alterações celulares como binucleação e apoptose (Figura 8). Isso mostra um aumento na frequência que foi diretamente proporcional ao aumento da concentração dos agentes a que os moluscos foram submetidos (LIMA et al., 2019b).

A tradicional metodologia de análise de viabilidade celular através do uso de coloração por exclusão de corante azul tripiano, também vem sendo introduzida em estudos de ecotoxicidade. Essa técnica consiste na utilização de um corante, o azul de Trypan, adicionado às células em estudo, onde observa-se uma coloração em tonalidade azul de células inviáveis, que ao terem sua membrana danificada permitem o fluxo do corante para o seu interior. As células viáveis, por sua vez, por terem as membranas celulares intactas não absorvem o corante do meio circundante (LOUIS; SIEGEL, 2011). Importante ressaltar que este método não permite diferenciar entre células apoptóticas e necróticas. Estudo realizado por Morais (2020), apontou que a frequência de células viáveis de moluscos *B. glabrata* quando expostos a águas de poços artesianos ficou entre 87-95%, demonstrando

que a utilização dessa técnica é de fato capaz de identificar a viabilidade de células hemocitárias desses invertebrados.

Figura 8 - Hemócitos de *Biomphalaria glabrata* com diferentes morfologias celulares após exposição ao oxyfluorfen. A) micronúcleo (seta); B) célula binucleada; C) apoptose.



Fonte: Lima et al. (2019b).

Outra metodologia capaz de detectar danos causados pelos compostos genotóxicos e mutagênicos a fim de minimizar o potencial risco à saúde, vem sendo bastante utilizada, através do Ensaio do Cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única. Uma técnica sensível que é usada para detectar danos no DNA. A princípio, o método ocorria em condições neutras, o que permitia apenas a detecção de quebras de fita dupla no DNA. Posteriormente, o ensaio passou a abranger reações que suportavam condições alcalinas, resultando então na detecção de danos no DNA de fita simples, dessa forma, proporcionou um aumento significativo nas aplicações do ensaio (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIĘCKA, 2016).

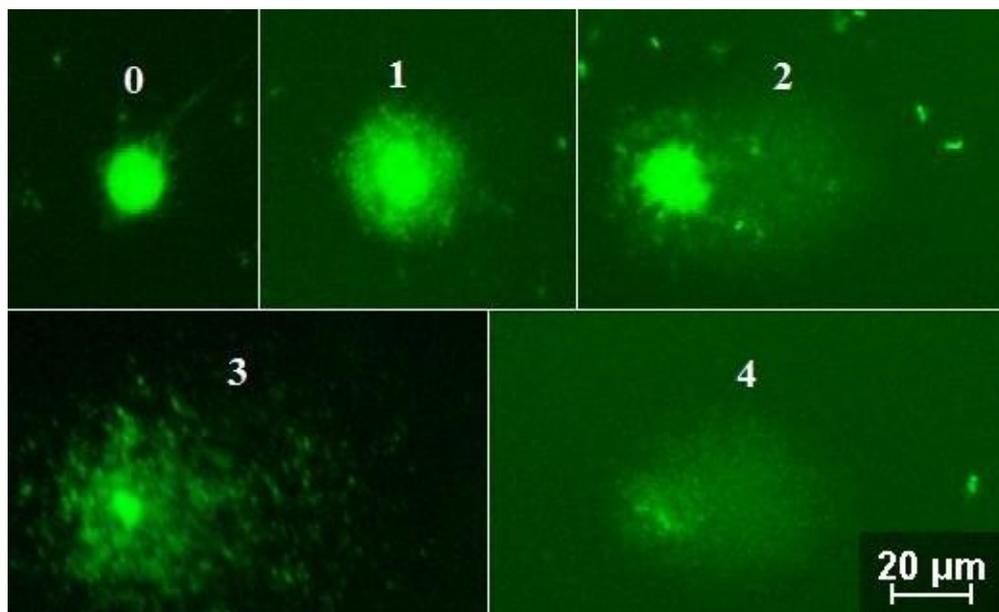
Basicamente, as células são adicionadas a um gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia, e com o auxílio de uma corrente elétrica o DNA das células que estiverem danificadas, vão migrar para fora do núcleo celular, formando então, a aparência de um cometa com cauda. O DNA das células que não estiverem danificadas (nucleóides intactos), permanecem dentro do núcleo formando a aparência de um círculo (SILVA, 2019). Os cometas são classificados e divididos em cinco categorias, de acordo com a extensão da migração de DNA: 0 = sem danos; 1 = baixo nível de danos; 2 = médio nível de danos; 3 = alto nível de danos e 4 = totalmente danificados. A classificação é realizada com base na aparência de

cometas, ou seja, comprimento da cauda, diâmetro da cabeça e intensidade (Figura 9) (GRAZEFEE et al., 2008).

Uma célula com DNA migrante se assemelha a um cometa com uma concentração de DNA na "cabeça" e uma migração em fuga difusa de DNA, denominada "cauda". Esta informação pode ser vital para compreender a resposta celular a fatores prejudiciais e prever efeitos biológicos nos níveis de organismo e população (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIĘCKA, 2016; COLLINS; EL YAMANI; DUSINSKA, 2017).

Os hemócitos oferecem diversas vantagens como células-alvo para teste de genotoxicidade *in vivo*. Estas células são altamente sensíveis a agentes genotóxicos, além disso, os hemócitos podem ser diretamente expostos a substâncias tóxicas circulando na hemolinfa e são, portanto, um alvo interessante para avaliação da genotoxicidade na monitoração ambiental (VILLELA et al., 2007; GRAZEFEE et al., 2008). Siqueira et al (2020) expuseram caramujos adultos de *B. glabrata* a concentrações de 150 e 500 mg L⁻¹ de lodo industrial (SRM 2782) por 48h, e identificaram um número significativamente maior de nucleóides danificados em relação ao grupo controle negativo, onde, provavelmente, a exposição ao agente químico tóxico, pode ter sobrecarregado a glândula hepato-pâncreas e dessa forma alterado a atividade das enzimas antioxidantes que estão presentes no molusco.

Figura 9 - Grau de danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.



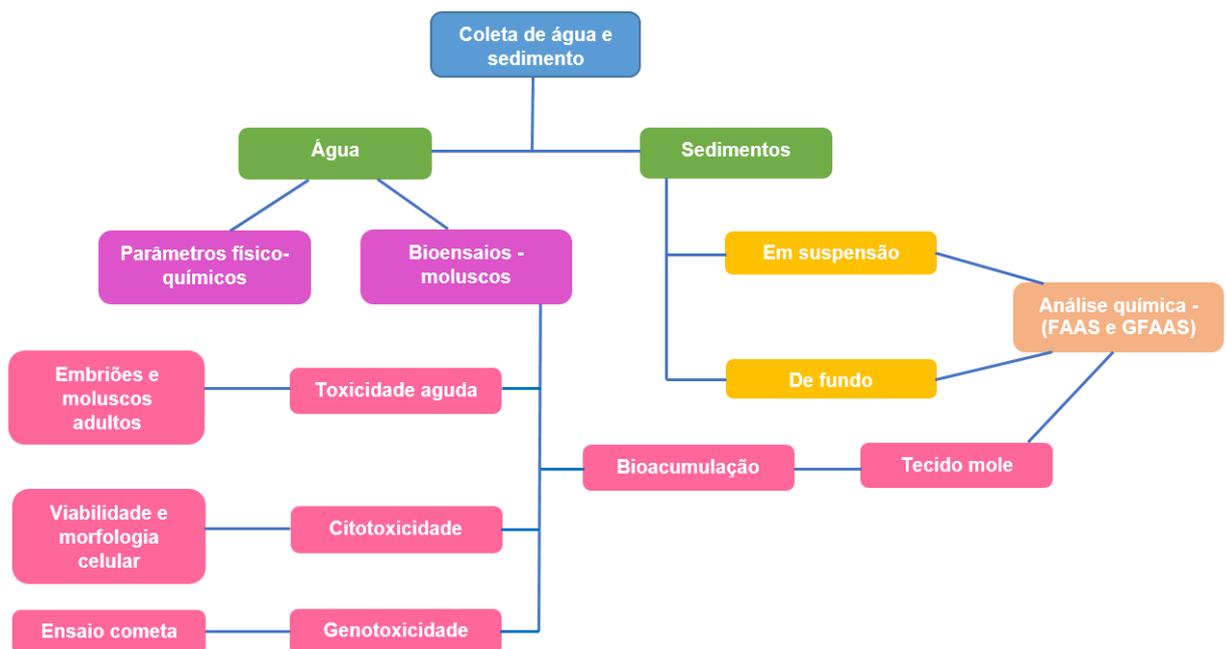
Fonte: Morais (2020).

Diante disso, pode-se observar que além de avaliar os parâmetros físico-químicos da água doce e quantificar os elementos-traço em sedimentos, a utilização de um invertebrado com uma vasta presença no ambiente aquático, como o molusco *Biomphalaria glabrata*, é muito importante para ajudar a elucidar os possíveis impactos ambientais que o rio Capibaribe está exposto no decorrer de parte do seu percurso até chegar ao Recife.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo empregou diversas metodologias para análise química da água e sedimentos do rio Capibaribe, além de bioensaios utilizando bioindicadores, biomarcadores e biomonitores para avaliação do impacto ambiental neste rio. As etapas do projeto de pesquisa podem ser visualizadas no fluxograma da Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática para realização dos ensaios experimentais.



Fonte: A autora (2021).

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A amostragem ocorreu em quatro cidades do estado de Pernambuco/Brasil, ao longo do rio Capibaribe, identificadas como:

P1 = Recife (8°02'29.7"S 34°59'38.0"W);

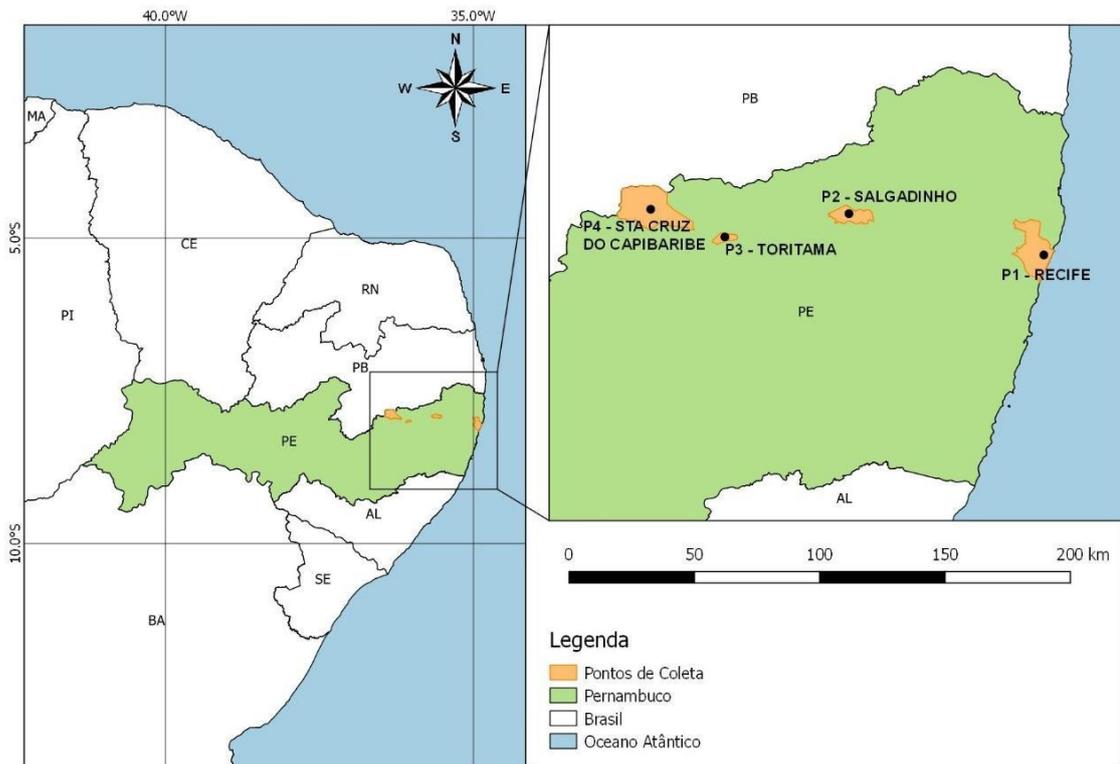
P2 = Salgadinho (7°56'23.9"S 35°38'47.0"W);

P3 = Toritama (8°00'43.9"S 36°03'26.4"W)

P4= Santa Cruz do Capibaribe (7°57'20.7"S 36°11'33.1"W), como pode ser observado na Figura 11.

As amostras P1 e P2 foram coletadas na entrada de cada cidade (a montante). P3 e P4 foram coletadas em locais que recebem efluentes de fábricas têxteis. Todas as coletas foram realizadas na estação seca e na estação chuvosa.

Figura 11 - Mapa com os pontos de coleta da água do rio Capibaribe, no estado de Pernambuco/Brasil. (P1) Recife; (P2) Salgadinho, (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.



Fonte: A autora (2021).

3.2 COLETAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTOS

A coleta e a análise das águas superficiais e do sedimento de fundo seguiram o preconizado pela ABNT (NBR 9898, 1987). Amostras de água do rio Capibaribe foram coletadas com auxílio de recipientes plásticos com capacidade para 20 L. Todos os recipientes foram devidamente identificados com a localização, data de coleta, hora e as condições meteorológicas do dia. Os valores de pH e condutividade elétrica foram aferidos no local e anotados em planilhas, ambos determinados pelo medidor portátil Hanna (HI-9828 Multiparameter).

As amostras de água utilizadas para os bioensaios foram armazenadas em recipientes de vidro com capacidade para 2 L, acondicionadas em caixas térmicas com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Radiobiologia do Departamento de

Biofísica e Radiobiologia da UFPE (DBR-UFPE). Para evitar a perda das condições físico-químicas da água coletada, foram realizados bioensaios com os moluscos no prazo máximo de 7 dias após a coleta. As amostras de água para o teste de sedimento em suspensão, foram armazenadas em quatro recipientes de polietileno com capacidade para 5 L, totalizando 20 L para cada ponto de coleta. Em seguida, as amostras de água foram levadas ao Serviço de Monitoração Ambiental (SEAMB) para o armazenamento durante 6 meses a 8 °C. Os sedimentos de fundo do rio foram coletados com o auxílio de pás de aço inoxidável abrangendo os primeiros 20 cm de sedimento superficial de fundo e armazenados em sacos de polietileno (20x25 cm), acondicionadas em caixas térmicas com gelo e encaminhadas ao SEAMB-CRCN/NE.

3.3 ANÁLISE DE ELEMENTOS QUÍMICOS

As amostras coletadas no rio Capibaribe foram submetidas a procedimentos de preparação, de acordo com a técnica analítica utilizada. Após passarem por todo tratamento químico, as amostras seguiram para análise por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Grafite – GFAAS e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama – FAAS.

3.3.1 Sedimento em suspensão

Para a análise dos sedimentos em suspensão, 20 litros das amostras de água foram armazenados por seis meses a 8 °C, para que ocorresse a sedimentação espontânea, de acordo com a metodologia descrita por França et al. (2010). Onde após a sedimentação espontânea a água do sobrenadante foi removida por sifonação (com auxílio de uma mangueira, devidamente esterilizada). O líquido restante foi submetido a centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos (centrífuga Excelsa II Modelo 206 BL - Fanem) para obtenção do material sólido. O sobrenadante foi descartado, com auxílio de uma seringa e o sedimento colocado em placa de Petri, que seguiu para o congelador, devidamente vedadas. Após o congelamento das amostras foi realizada a liofilização por 48h, até a obtenção do peso constante, e em seguida as amostras foram cominuídas com auxílio de pistilo e almofariz de vidro.

3.3.2 Sedimento de fundo

Após a chegada do sedimento de fundo ao laboratório, as amostras foram secas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e em seguida foram submetidas a peneiração, com peneira de Nylon para retirada de detritos. Posteriormente, as amostras de sedimentos foram colocadas em estufa a 150 °C por um período de 48h. Após esse período as amostras foram então cominuídas até tamanho de partículas menores que 0,5 mm, com auxílio de um pistilo de vidro e em seguida armazenadas em dessecadores (livre de umidade) até a realização da digestão química para análise da quantificação química dos elementos-traço.

3.3.3 Processos das análises químicas (sedimentos)

Os elementos-traço das porções-testes das amostras cominuídas dos sedimentos em suspensão e de fundo (0,1 g) e dos materiais de referência SRM 2710 - Montana Soil, produzidos pelo National Institute of Standard and Technology-NIST, foram quantificados pelas seguintes técnicas analíticas: Espectrometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS) e a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE), seguindo a metodologia de Mélo (2014). Os brancos analíticos também foram preparados quimicamente junto com as amostras e materiais de referência.

3.3.3.1 Tratamento químico das amostras

Porções-teste das amostras foram submetidas ao tratamento químico em forno digestor (DGT 100 Plus, Provecto Analítica) para a obtenção das soluções de amostra, assim como porções analíticas dos materiais de referência e do branco analítico. As etapas do procedimento estão relacionadas na Tabela 2:

Tabela 2 - Representação do processo de digestão química para análise dos elementos-traço em sedimentos.

Digestão química	Sedimentos
Pesagem das amostras	0,1 g
Adição de HNO ₃ p.a (~65%) em tubos do forno micro-ondas	5 mL
Ciclo de digestão (pré digestão, digestão e esfriamento)	5 min – 3300 W 10 min – 640 W 10 min – 0 W
Repouso em capela de fluxo até atingir temperatura ambiente	
Amostras filtradas e adicionado 5 mL de HNO ₃ a 5%, em tubos falcon	Avolumadas para 30 mL com água ultrapura (Milli-Q)
Posteriormente, os tubos falcon foram pesados e diminuídos do valor dos tubos vazios para determinar o volume final da amostra	

Fonte: A autora (2021).

Após a digestão, todas as amostras seguiram para análise por FAAS e GFAAS, do Serviço de Monitoração Ambiental (SEAMB) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE).

3.3.3.1.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Após o tratamento químico, cada amostra, materiais de referência e brancos analíticos foram submetidos às análises no equipamento VARIAN AAS 220 FS. As curvas analíticas foram construídas empregando-se soluções-padrão Merck (1000 mg L⁻¹) para cada elemento químico a ser analisado. Foram ajustadas as condições analíticas de comprimento de onda (nm), diâmetro da janela (nm) e gás combustível/oxidante para quantificação dos elementos químicos a serem analisados. Esta técnica foi utilizada para realizar a quantificação de Cu, Fe e Zn (cobre, ferro e zinco).

3.3.3.1.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS)

A análise foi determinada pelo equipamento VARIAN AAS 220 ZEEMAN com forno grafite GTA 120. Também ocorreu a calibração do equipamento com soluções-padrão Merck. Os elementos-traço quantificados foram Cd, Cr, Ni, V e Cu (cádmio, cromo, níquel, vanádio e cobre). Para a análise do elemento Cr foram utilizados os modificadores de matriz solução de paládio – Pd (500 mg L^{-1}) e ácido ascórbico (2%), eles foram adicionados à amostra para prevenir a perda do analito durante a etapa de queima, pela sua conversão numa forma menos volátil.

3.3.3.2 Incerteza analítica

A incerteza analítica é o parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao que foi mensurado. As incertezas analíticas das medições por FAAS e GFAAS foram obtidas a partir da soma quadrática das incertezas referentes à precisão (repetições analíticas) e à exatidão (desvio com relação aos materiais de referência que foram analisados) com a obtenção das incertezas analíticas expandidas em nível de 95% de confiança ($k = 2$) (ELISON; WILLIAMS, 2012).

3.3.3.3 Número E_n – qualidade do procedimento analítico

A partir dos resultados analíticos e incertezas dos materiais de referência analisados, foram empregados os cálculos referentes ao Número E_n , definido como a diferença entre o valor obtido na análise da amostra e o valor certificado, dividido pela raiz quadrada da soma quadrática das incertezas analíticas expandidas conforme a equação abaixo, recomendada para avaliação da qualidade dos procedimentos analíticos conforme a ISO 13528 (2005). Neste teste, os valores do Número E_n para cada analito devem estar dentro do intervalo entre -1 e 1, indicando controle de qualidade em nível de 95% de confiança:

$$En = \frac{X_{obs} - X_{ref}}{\sqrt{U_{obs}^2 + U_{ref}^2}} \quad (1)$$

em que,

X_{obs} = valor observado;

X_{ref} = valor certificado para o material de referência;

U_{obs}^2 = incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança para o valor observado;

U_{ref}^2 = incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança do valor certificado para cada material de referência.

3.3.3.4 Fator de contaminação (FC) e Índice de carga de poluição (PLI)

O fator de contaminação (FC) em sedimentos em suspensão e de fundo de rio foram calculados de acordo o protocolo de HAKANSON (1980), onde FC é a razão entre a concentração obtida do elemento químico no sedimento sobre a concentração do valor de referência de dados da literatura:

$$FC = \frac{C_{obs}}{C_{referência}} \quad (2)$$

em que,

C_{obs} = concentração do elemento químico entre as amostras (mg kg^{-1});

$C_{referência}$ = concentração de referência do elemento químico no sedimento (mg kg^{-1}).

Os valores de referência para os sedimentos em suspensão foram determinados por Silva et al. (2015) – rio Ipojuca ($08^{\circ}13'10''$ S $35^{\circ}43'09''$ W), e os sedimentos de fundo seguiram os valores de referência da Instrução Normativa CPRH n° 007/2014. Após a obtenção do fator de contaminação foi calculado o Índice de Carga de Poluição (PLI) conforme descrito a seguir:

$$PLI = \sqrt[n]{(FC_1 \times FC_2 \times FC_3 \dots \times FC_n)} \quad (3)$$

em que,

N = é o número de elementos químicos estudados;

FC = fator de contaminação obtido.

Proposto por Tomlinson et al. (1980), o índice de carga de poluição fornece de forma simples e comparativa, a avaliação da qualidade do ponto estudado, em que o valor de $PLI > 1$ indica a degradação da qualidade do local, e $PLI < 1$ indica que não há poluição. Os resultados foram analisados seguindo os critérios descritos na Tabela 3 (WANG, X. et al., 2019; MEMOLI et al., 2019).

Tabela 3 - Classificação para fator de contaminação (FC) e Índice de carga de poluição (PLI).

FC	Classificação
FC < 1	Indica baixo fator de contaminação do sedimento
1 ≤ FC < 3	Indica moderado fator de contaminação do sedimento
3 ≤ FC < 6	Indica considerável fator de contaminação do sedimento
FC ≥ 6	Indica alto fator de contaminação do sedimento
PLI < 1	Indica apenas níveis basais de poluentes estão presentes
PLI > 1	Indica deterioração da qualidade do local

Fonte: Wang et al. (2019), Memoli et al. (2019).

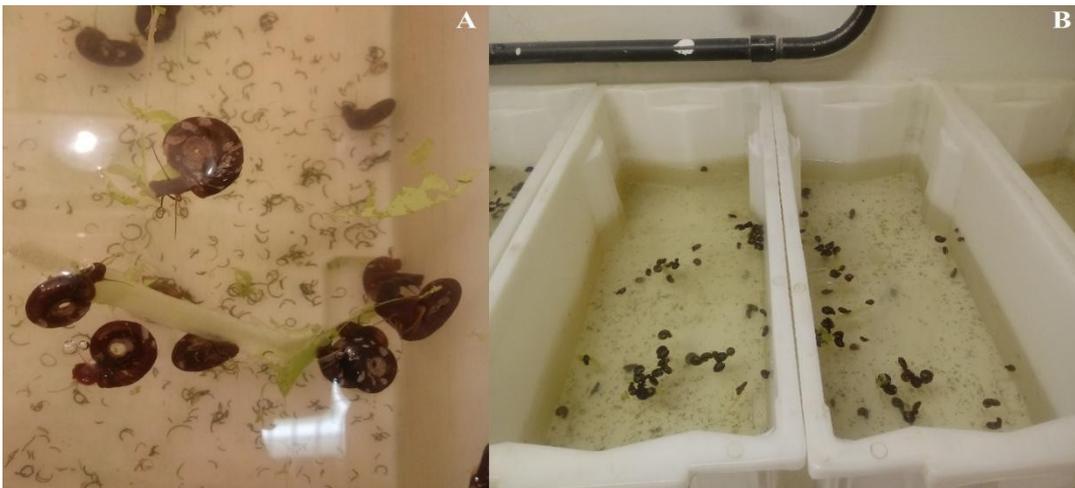
3.4 BIOENSAIOS

Os bioensaios de embriotoxicidade, toxicidade aguda, citotoxicidade, genotoxicidade e bioacumulação de elementos-traço foram realizados com moluscos *Biomphalaria glabrata* mediante a exposição dos organismos às amostras da água do rio Capibaribe. Para isto, os moluscos foram criados e mantidos em condições laboratoriais descritas a seguir.

3.4.1 Criação e manutenção do molusco *Biomphalaria glabrata*

Foram utilizados moluscos adultos da espécie *B. glabrata* pigmentados, com idade de três meses e diâmetro de concha de 10 a 14 mm, oriundos do moluscário do Laboratório de Radiobiologia do DBR-UFPE (Figura 12), mantidos em tanques com capacidade de 20 L de água filtrada e decolorada, temperatura (25 ± 1 °C) e pH ($7,0 \pm 1$). Os caramujos foram dispostos em recipientes individuais (180 mL de água) por 5 dias consecutivos para a confirmação da maturidade sexual (deposição de ovos), após essa confirmação os animais foram então separados para realização dos bioensaios. Durante o ensaio experimental os animais não foram alimentados, para evitar que houvesse alguma interferência proveniente da alface (*Lactuca sativa*).

Figura 12 - A) *Biomphalaria glabrata* pigmentado adulto; B) Cubas de criação dos moluscos.



Fonte: A autora (2021).

3.4.2 Embriotoxicidade

Para o teste de embriotoxicidade as desovas dos moluscos adultos foram coletadas através de placas de filmes de polietileno, previamente colocados (24h antes do ensaio) nas superfícies das águas dos aquários criadouros. Posteriormente as desovas foram separadas e analisadas quanto ao estágio embrionário com auxílio de microscópio estereoscópico (M3B; Wild Heerbrugg). A fase embrionária

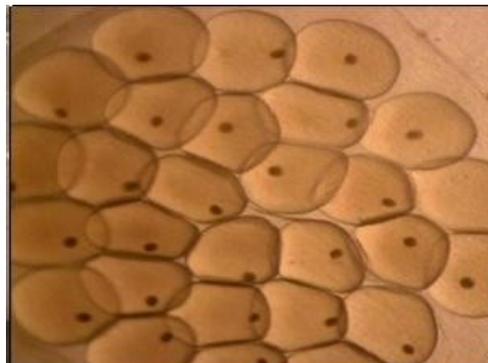
utilizada neste experimento foi a de blástula, caracterizada por se encontrar 24 horas após a primeira clivagem, segundo Kawano, Nakano e Watanabe (2008), Figura 13.

Os grupos embrionários foram compostos por 100 embriões dispostos em placas de petri e expostos da seguinte forma: controle negativo com água filtrada e decolorada; controle positivo (niclosamida, NCL $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os grupos expostos a amostras da água do rio Capibaribe de acordo com os pontos de coletas P1, P2, P3 e P4. O experimento foi realizado em triplicata.

A exposição ocorreu por 24 h, posteriormente as desovas dos embriões foram lavadas com água filtrada e decolorada, para retirar o excesso de amostras do rio (o grupo dos controles passaram pelo mesmo processo) e ocorreu a análise por oito dias consecutivos, período suficiente para o total desenvolvimento embrionário, de acordo com Siqueira et al. (2020) – analisados pelo estereoscópio (M3B; Wild Heerbrugg).

Os parâmetros analisados foram a viabilidade (embriões que conseguiram eclodir) e inviabilidade (embriões mortos e/ou malformados). Temperatura e pH se apresentaram constantes durante o estudo.

Figura 13 - Embriões de *Biomphalaria glabrata* observados em microscópio estereoscópico, no estágio de blástula. Objetiva de 40x.



Fonte: A autora (2021).

3.4.3 Toxicidade aguda

Para avaliar a toxicidade das amostras de água do rio Capibaribe foram utilizados 10 espécimes de moluscos adultos de *B. glabrata* expostos por 48 horas, em recipientes de vidro com capacidade para 100 mL. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os grupos foram dispostos da seguinte forma: controle

negativo (água filtrada e decolorada); controle positivo (niclosamida, NCL - 1 µg mL⁻¹) e os grupos experimentais com as amostras da água do rio coletadas em diferentes locais, como descrito anteriormente.

Os parâmetros avaliados foram: despigmentação da concha, liberação de hemolinfa, ausência de batimentos cardíacos e movimentos corporais observados por meio do microscópio estereoscópio - (M3B; Wild Heerbrugg) (SIQUEIRA et al., 2020).

Os moluscos que sobreviveram ao teste de toxicidade aguda foram utilizados para os ensaios de citotoxicidade (n= 5, por grupo), viabilidade celular (n=7, por grupo), genotoxicidade (n=8, por grupo) e bioacumulação de elementos-traço (n=20, por grupo). Foram utilizados 40 animais adultos para cada grupo amostral, totalizando 240 animais.

3.4.4 Viabilidade de hemócitos

Para cada molusco dos grupos expostos e não exposto (n=7), foram coletadas 20 µL de hemolinfa, adicionada ao corante Azul de Trypan 0,4% (1:1), colocadas imediatamente na câmara de Neubauer e mantidas por aproximadamente 2 min, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), para contagem das células hemocitárias viáveis e inviáveis, através de microscopia óptica (Leica DM1000, aumento de 400x), segundo a metodologia de Waczuk et al. (2015) com adaptações.

Os grupos experimentais foram: Grupo 1 - controle negativo (água filtrada e decolorada); Grupo 2 - Controle positivo (H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio – 10 mM) e Grupo 3 - Amostras do rio Capibaribe (P1, P2 e P3). A contagem das células ocorreu da seguinte forma:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número total de células}} \quad (4)$$

em que, a porcentagem de células não coradas representa a porcentagem de células viáveis na suspensão. As células inviáveis ficam coradas em azul e as células viáveis ficam translúcidas (sem coloração).

Após a verificação da viabilidade das células passou-se para a etapa de avaliação do dano ao DNA das células hemocitárias dos moluscos expostos e não expostos, por meio do ensaio do cometa.

3.4.5 Genotoxicidade: Ensaio cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado como descrito por Singh et al. (1988), com modificações. Foram coletadas 100 µL de hemolinfa de *B. glabrata* e homogeneizados em agarose de baixo ponto de fusão (1:1). Imediatamente, este homogeneizado foi colocado sobre uma lâmina de microscópio, previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% dissolvida em sulfeto de chumbo (PbS - pH 7,4), coberto com lamínula e mantido a 8 °C (10 min). Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 24 h a 8 °C.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal, contendo solução de tampão alcalino, pH 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM), por 20 minutos. A eletroforese foi iniciada nas seguintes condições: 0,74 V/cm e 300 mA por 20 minutos a 4 °C. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) por 15 min e fixadas com álcool absoluto por 10 minutos.

Na etapa seguinte, as lâminas foram coradas com 50 µL de uma solução de SYBR safe (Invitrogen) (1:500). Analisadas 100 células por animal em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm, o experimento foi realizado em quintuplicada. A análise visual de danos no DNA foi realizada de acordo com Collins et al. (2008).

Os grupos experimentais: Grupo 1 - controle negativo (água filtrada e declorada); Grupo 2 - Controle positivo (MMS - Metanossulfonato de metila – 0,2 mM) e Grupo 3 - Amostras do rio Capibaribe (P1, P2 e P3), cada grupo continha 8 animais.

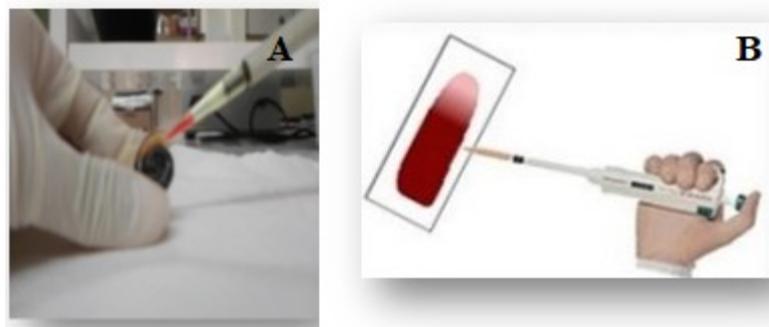
3.4.6 Ensaio de citotoxicidade em hemócitos de *B. glabrata*

A citotoxicidade celular foi avaliada por meio dos estudos com hemócitos, de acordo com a técnica desenvolvida por Silva et al. (2013), com adaptações. Em uma lâmina de microscopia foi colocada 100 µL de hemolinfa de *B. glabrata* e a mesmo volume de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) para evitar coagulação. Em seguida a lâmina foi colocada em câmara úmida por 30 minutos (Figura 14). Após esse período, foi adicionado em cada lâmina 200 µL de glutaraldeído a 1%, por 10 min. As lâminas foram enxaguadas com Ringer (10 mM) e coradas com Giemsa (5%) por 5 min, lavadas em água destilada e secadas em temperatura ambiente.

Posteriormente, as lâminas foram analisadas pelo microscópio óptico (Leica DM1000, aumento de 1000x). Para cada grupo de tratamento foram analisadas 1000 células por réplica. O experimento foi realizado em triplicata. Durante a análise foram contabilizadas alterações celulares como apoptose celular (AP), binucleação (BN) e micronúcleo (MN), protocolo de identificação descrito por Lima et al. (2019b).

Os grupos experimentais: Grupo 1 - controle negativo (água filtrada e declorada); Grupo 2 - Controle positivo (Colcemida - 0,015 mg L⁻¹) e Grupo 3 - Amostras do rio Capibaribe (P1, P2 e P3), cada grupo continha 5 animais.

Figura 14 - A) Coleta de hemolinfa; B) Preparação das lâminas.



Fonte: A autora (2021).

3.4.7 Bioacumulação em moluscos (tecido mole)

Para a análise da bioacumulação de elementos químicos em moluscos *B. glabrata*, expostos e não expostos a amostras das águas do rio Capibaribe, foram analisados os tecidos moles dos moluscos, ou seja, todo o corpo do animal. Para isto, foram removidas as conchas dos moluscos por meio da técnica de exposição

ao vapor de água à temperatura de 70 °C (Figura 15). Após a separação, as amostras foram identificadas e congeladas a -4 °C e em seguida foram liofilizadas, até atingir o peso constante. Posteriormente, as amostras foram cominuídas e homogeneizadas com auxílio de almofariz de vidro até a obtenção de partículas de tamanho de 0,5 mm. As amostras foram armazenadas em dessecadores até a realização do processo de digestão e análise em Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) e Espectrometria de Absorção Atômica com Forno Grafite (GFAAS). Foram utilizados 20 moluscos para cada grupo estudado.

Figura 15 - Dissecação parcial do molusco para avaliação da bioacumulação de elementos-traço.



Fonte: A autora (2021).

3.4.7.1 Análise química dos moluscos

Os elementos-traço das porções-testes das amostras cominuídas dos moluscos (0,4 g) e do material de referência TM-01 – Tecido de Mexilhão, produzido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, também foram quantificados pelas técnicas analíticas de FAAS e GFAAS, seguindo a metodologia de Mélo (2014). Os brancos analíticos também foram preparados quimicamente junto com as amostras e o material de referência. O tratamento químico das amostras dos moluscos seguiu as seguintes etapas (Tabela 4):

Após a digestão, todas as amostras seguiram para análise por FAAS para a quantificação dos elementos Fe e Zn, e GFAAS para a quantificação de Cu, Cd, Cr, Ni, V. Também foi calculada a incerteza analítica e o Número E_n , da mesma forma que calculada para os sedimentos (APÊNDICE A).

Tabela 4 - Representação do processo de digestão química para análise dos elementos-traço em moluscos.

Digestão química	Caramujos
Pesagem das amostras	0,4 g
Adição de HNO ₃ p.a (~65%) em tubos do forno micro-ondas	9 mL
Ciclo de digestão (pré digestão, digestão e esfriamento)	5 min – 220 W 10 min – 440 W 10 min – 0 W
Repouso em capela de fluxo até atingir temperatura ambiente	
Amostras filtradas e adicionado 5 mL de HNO ₃ a 5%, em tubos falcon	Avolumadas para 20 mL com água ultrapura (Milli-Q)
Posteriormente, os tubos falcon foram pesados e diminuídos do valor dos tubos vazios para determinar o volume final da amostra	

Digestão em forno digestor (DGT 100 Plus, Provecto Analítica).

Fonte: A autora (2021).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliação da toxicidade (embriões e adultos) e a ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade foram utilizados o ANOVA (análise de variância) e o teste Student-Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prism version5.0 (GraphPad Prism, San Diego, Califórnia, USA), as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

A descrição das concentrações dos elementos-traço quantificados nos sedimentos e moluscos e valores de referências foram realizadas através da estatística descritiva a partir dos cálculos de média e desvio padrão, a partir do programa STATISTICA 1.0. Valores significativos foram avaliados em nível de 95% de confiança.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção abrange a avaliação físico-química de amostras da água do rio Capibaribe; demonstração da qualidade do procedimento analítico para os elementos químicos determinados por GFAAS e FAAS nas amostras de sedimentos em suspensão, de fundo e bioacumulação em moluscos *B. glabrata*; e análise de toxicidade aguda, genotóxica e mutagênica da água do rio sobre embriões e animais adultos.

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Os valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de água do rio Capibaribe, como o pH e a condutividade elétrica (CE), durante estação seca e chuvosa podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos do rio Capibaribe. CE = condutividade elétrica.

Ponto de coleta	Estação seca		Estação chuvosa	
	pH	CE (mS.cm ⁻¹)	pH	CE (mS.cm ⁻¹)
P1	6,21	0,58	6,86	0,13
P2	6,16	4,80	6,21	3,31
P3	7,03	6,50	7,43	3,84
P4	7,35	4,90	7,70	5,22

Fonte: A autora (2021).

Os valores de pH na água do rio Capibaribe apresentaram-se com intervalo entre 6,16 a 7,70 em todos os pontos de coleta e nas estações da amostragem (seca e chuvosa), não comprometendo a sobrevivência dos moluscos *B. glabrata* que suportam pH de 6,0 a 7,8 (REY, 2015).

É válido ressaltar que as cidades de Toritama e Santa Cruz do Capibaribe (P3 e P4, respectivamente) pertencem à zona de indústrias têxteis do estado de Pernambuco. Os processos de tingimentos, limpeza, branqueamento, entre outros, dessa classe de indústrias são ajustados a um pH alcalino (BISSCHOPS; SPANJERS, 2003; CHEN et al., 2020) o que pode explicar o fato da medição de pH

das águas coletadas nos pontos P3 e P4 se encontrarem em estado neutro a levemente alcalino (7,0 a 7,7).

Antes da exposição dos animais às águas coletadas, foi aferido o pH das amostras, e não foi observada nenhuma variação em relação ao pH anotado durante a coleta, que pudesse interferir nos resultados.

Os valores de condutividade elétrica variaram entre 0,13 a 6,50 mS.cm⁻¹. Apresentando maiores concentrações na estação seca do que na estação chuvosa, porém como é possível observar na Tabela 3, o ponto P4 não seguiu esse padrão, apresentando maior CE na estação chuvosa. A presença de sais de cloreto utilizados em atividades têxteis pode levar a uma alta condutividade elétrica (BUSCIO et al., 2019). Pathak et al. (2020) observaram ao coletar águas residuais de indústrias de tingimento valores de pH em torno de 8,6 e a condutividade 5,46 mS.cm⁻¹, valor da CE próximo ao obtido em P4.

Pode-se constatar que na estação chuvosa houve uma diminuição dos valores de CE, provavelmente devido às chuvas, que influenciam na diluição da carga poluidora que está presente no rio, normalmente em períodos de chuva os valores de CE regridem diretamente proporcional a uma vazão maior das águas. Valores da condutividade acima de 0,1 mS.cm⁻¹, já indicam que o ambiente está impactado (ARAÚJO et al., 2015), nossos resultados mostram valores entre 0,13 a 6,50 mS.cm⁻¹ ressaltando que os trechos em que as amostras de água foram coletadas se apresentam bastantes poluídas.

4.2 ANÁLISES QUÍMICAS DOS SEDIMENTOS

A qualidade do procedimento analítico para a determinação dos elementos-traço nos sedimentos das amostras do rio Capibaribe foram essenciais para garantir os resultados de comparação entre os pontos diferentes no estudo de monitoração ambiental. Todos os resultados analíticos dos materiais de referência estiveram dentro do intervalo esperado, indicando a qualidade do procedimento analítico em nível de 95% de confiança (valores de Número E_n) (Apêndice A).

4.2.1 Fator de contaminação (FC) e Índice de carga de poluição (PLI)

Lembrando que, $FC < 1$ indica baixo fator de contaminação; entre 1 e 3 fator moderado; entre 3 e 6 já é considerado contaminado; e > 6 alto fator de contaminação. Na Tabela 6, apresentam-se os resultados do cálculo dos Fatores de Contaminação (FC) para os elementos-traço analisados nos sedimentos em suspensão. Todos os pontos analisados apresentaram o $PLI > 1$, indicando deterioração da qualidade do local. Para os cálculos, foram utilizados os valores de sedimentos em suspensão encontrados para o rio Ipojuca - PE ($08^{\circ}13'10''$ S $35^{\circ}43'09''$ W) (SILVA et al., 2015). Para o sedimento de fundo, foi utilizado os valores de referência da Instrução Normativa CPRH n° 007/2014.

Tabela 6 – Valores do fator de contaminação para os sedimentos em suspensão do rio Capibaribe, e valores de PLI (Índice de carga de poluição). (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.

Estação	Local	Fe	Zn	Cu	Ni	Cd	V	Cr	PLI
Seca	P1	19,71	2,57	7,53	2,09	1,52	0,35	4,83	2,98
	P2	6,22	0,96	3,53	7,78	1,45	0,61	7,60	2,72
	P3	0,94	2,76	13,54	3,05	5,51	0,20	1,22	2,04
	P4	4,45	2,78	20,88	4,17	5,35	0,29	3,17	3,40
Chuvosa	P1	23,49	1,70	6,04	9,41	2,80	0,66	6,36	4,29
	P2	17,83	6,38	7,83	19,06	3,81	0,76	14,65	6,87
	P3	1,16	3,80	21,63	5,03	3,42	0,23	1,48	2,48
	P4	13,94	8,45	29,75	8,13	10,10	0,77	10,51	8,13

*valor em negrito indicam áreas poluídas

Fonte: A autora (2021).

Os valores de FC para os sedimentos de fundo estão apresentados na Tabela 7, nos pontos P1 e P2 (estação seca) e nos pontos P1, P2 e P3 (estação chuvosa) os valores de PLI indicaram apenas a presença de níveis basais dos elementos-traço ($PLI < 1$). Ao contrário de P3 e P4 (estação seca) e P4 (estação chuvosa) com $PLI > 1$.

Tabela 7 - Valores do fator de contaminação para os sedimentos de fundo do rio Capibaribe, e valores de PLI (Índice de carga de poluição). (P1) Recife; (P2) Salgadoinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.

Estação	Local	Fe	Zn	Cu	Ni	Cd	V	Cr	PLI
Seca	P1	0,81	0,08	0,57	0,21	0,31	0,31	0,37	0,31
	P2	0,73	0,07	0,31	0,61	0,25	0,43	1,10	0,38
	P3	4,33	1,62	26,55	6,48	7,36	2,19	7,89	5,51
	P4	4,51	2,26	7,99	2,55	7,04	1,79	3,68	3,71
Chuvosa	P1	0,99	0,13	0,62	0,58	0,24	0,47	0,94	0,47
	P2	3,69	0,40	1,80	2,80	0,81	1,68	2,88	1,62
	P3	2,29	0,55	3,09	2,08	1,10	1,16	3,36	1,66
	P4	10,06	3,32	12,35	5,71	12,73	3,98	6,41	6,93

*valor em negrito indicam áreas poluídas

Fonte: A autora (2021).

Observaram-se as maiores concentrações de Cu na estação chuvosa em P4, para sedimento em suspensão (29,75) e sedimento de fundo de rio (12,35), indicando o alto fator de contaminação ($FC \geq 6$). Um estudo feito no rio Ganga, na Índia, mostrou valores de FC para cobre de 9,39 para os sedimentos de fundo, os autores sugerem que a contaminação esteja relacionada com as atividades de indústrias de couro, presentes próximas a região do rio (SIDDIQUI; PANDEY, 2019), o PLI também se apresentou contaminante (>1).

4.2.2 Caracterização química

Os dados das quantificações de elementos-traço na sedimentação espontânea (Figura 16) demonstraram uma maior concentração dos elementos-traço na estação chuvosa do que na estação seca. Houve uma grande variação entre os pontos e os elementos quantificados. As concentrações de Cu ($95,60 \text{ mg kg}^{-1}$) e Zn ($240,81 \text{ mg kg}^{-1}$) na estação chuvosa para o P3. Em P2, foi observada concentração

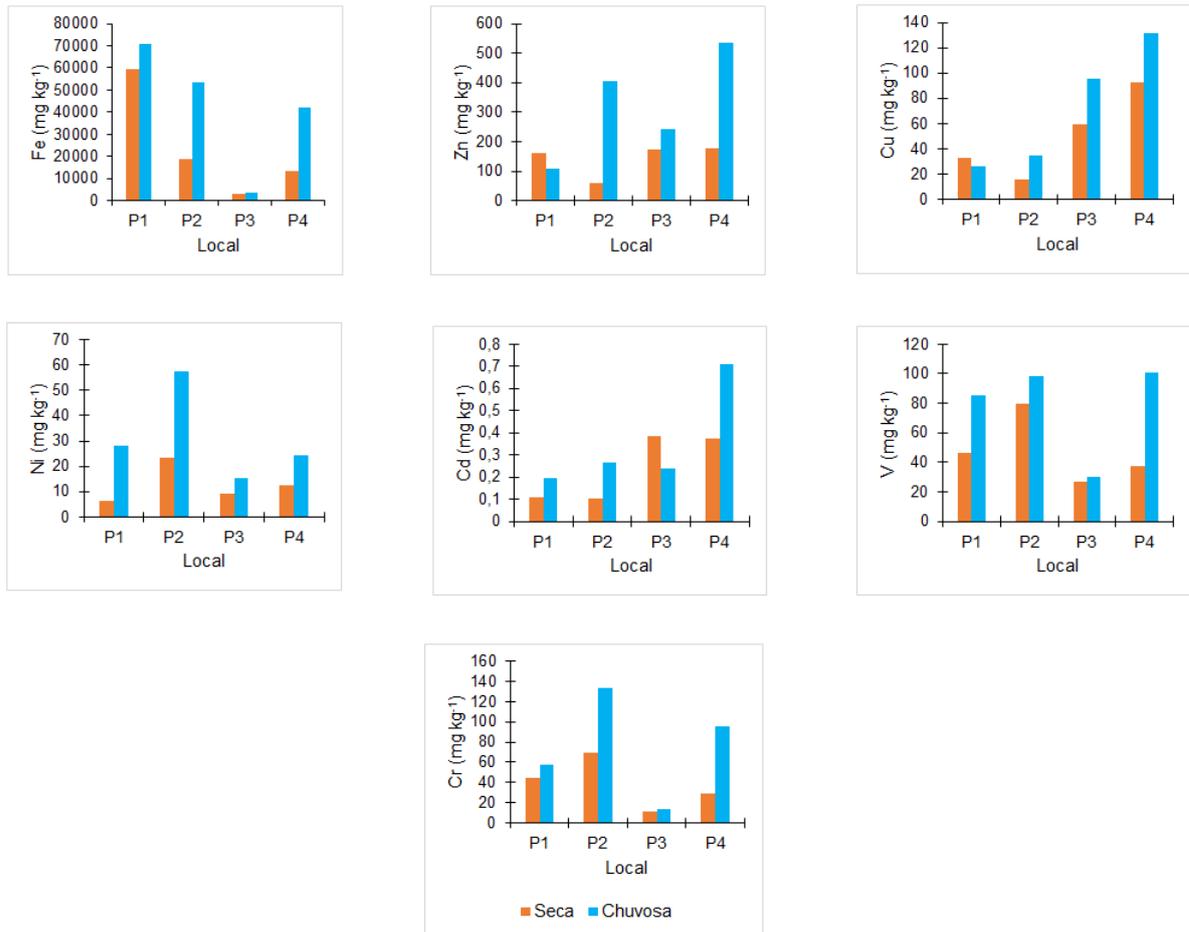
elevada em Cr ($133,35 \text{ mg kg}^{-1}$), Ni ($57,38 \text{ mg kg}^{-1}$) e Zn ($404,05 \text{ mg kg}^{-1}$) na estação chuvosa.

As maiores concentrações de elementos-traço foram observadas na estação chuvosa, em que ocorre uma alta descarga da água. Alguns autores indicaram que nesse período possa ocorrer um efeito de diluição (SILVA et al., 2015; THORSLUND et al., 2012), porém como os pontos de coletas estão em áreas não preservadas com ausência da mata ciliar, existe maior escoamento de substâncias oriundas das margens, além do que, substâncias de um local do rio podem ser transportadas e somadas com as substâncias que existem em outros locais (SIMÕES, 2017).

As concentrações elevadas em P2 durante a estação chuvosa evidenciam o $PLI > 1$, a presença elevada de Zn e Ni podem ser indicativas de contaminação antropogênica, pois P2 se localiza em uma região sem a presença de grandes indústrias. Cromo pode formar complexo insolúveis junto com a matéria orgânica, aumentando sua capacidade de retenção ao ser arrastado do ambiente terrestre até o ambiente aquático (BEZERRA; BATISTA; SILVA, 2018; ANDARANI et al., 2021).

Quando as concentrações dos elementos-traço presentes nos sedimentos de fundo de rio são comparadas entre as estações (Figura 17), observam-se que os maiores valores obtidos ocorreram em P3 na estação seca quando comparados aos demais pontos, como Fe (22200 mg kg^{-1}), Zn (156 mg kg^{-1}), Cu (222 mg kg^{-1}), Ni ($47,2 \text{ mg kg}^{-1}$), Cd ($0,37 \text{ mg kg}^{-1}$), V (53 mg kg^{-1}), e Cr (114 mg kg^{-1}), encontram-se acima do permitido pela resolução n° 454/2012 do CONAMA, que permite níveis de Zn (123), Cu (35,7), Ni (18), Cd (0,6) e Cr (37,3) em mg kg^{-1} , para sedimentos de água doce. Em relação aos pontos P1 e P2, ocorreu um crescimento linear entre as estações seca e chuvosa.

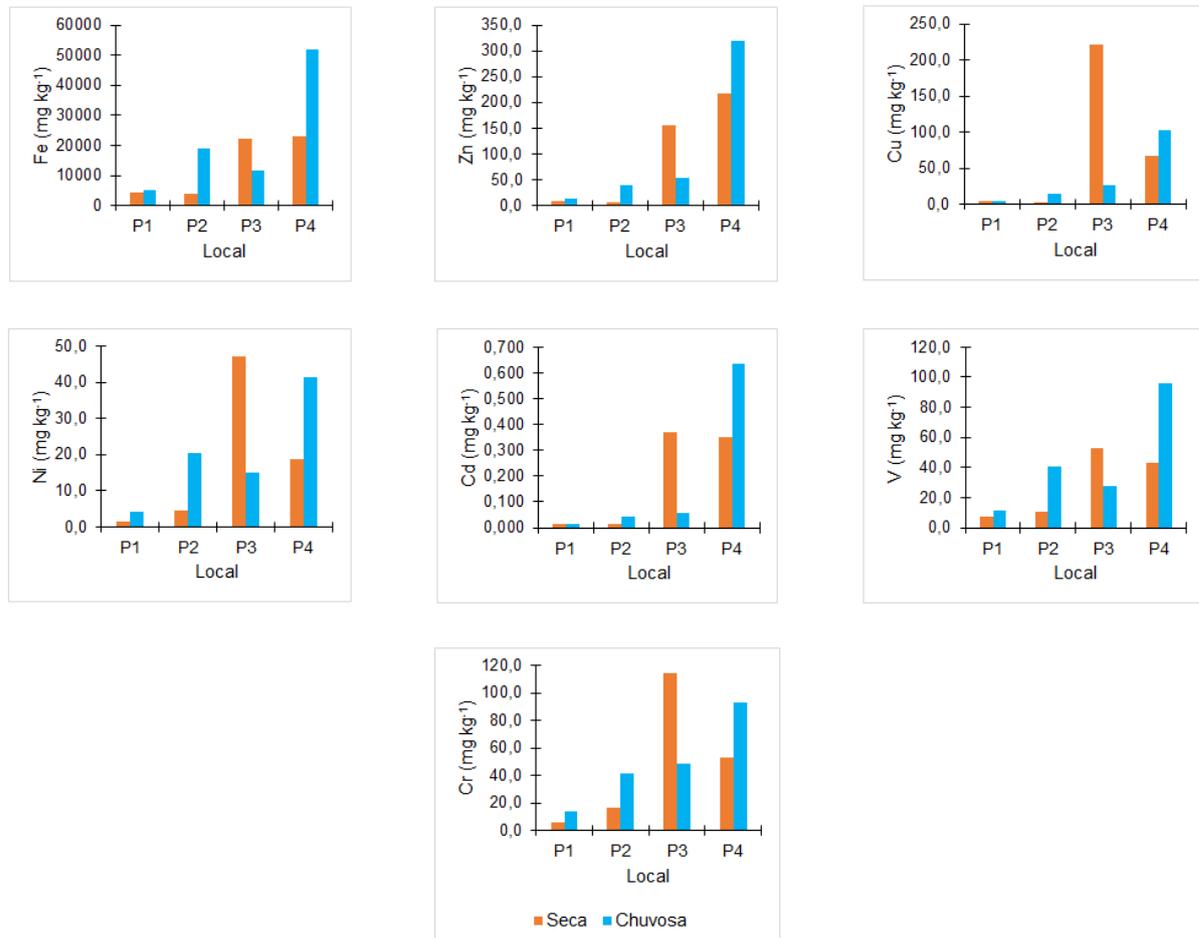
Figura 16 – Quantificação dos elementos-traço analisados no sedimento em suspensão do rio Capibaribe. (P1) Recife; (P2) Salgadoinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.



Fonte: A autora (2021).

Em um estudo feito por Silva et al. (2015), elementos-traço avaliados em sedimentos de fundo do rio Ipojuca - PE, apresentaram valores bem abaixo dos encontrados nesse estudo para o ponto P3, Fe (10600), Zn (93,1), Cu (4,6), Ni (8,2), Cd (0,1) e Cr (19,4) em concentração de mg kg^{-1} .

Figura 17 - Quantificação dos elementos-traço analisados no sedimento de fundo do rio Capibaribe. (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe.



Fonte: A autora (2021).

As águas do rio Capibaribe sofrem agressões das mais variadas fontes de carga de poluição, incluindo o uso da agricultura com substâncias químicas, pesticidas e inseticidas; esgotos não tratados de residências domésticas e das atividades industriais. As quantificações elevadas de elementos-traço em P3 na estação seca corroboram com os dados apresentados no FC e PLI, em que o local P3 mostrou-se extremamente poluído em relação aos demais pontos.

4.3 BIOENSAIOS

Os bioensaios foram realizados com embriões e moluscos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata* expostos às amostras de água do rio Capibaribe. Os testes

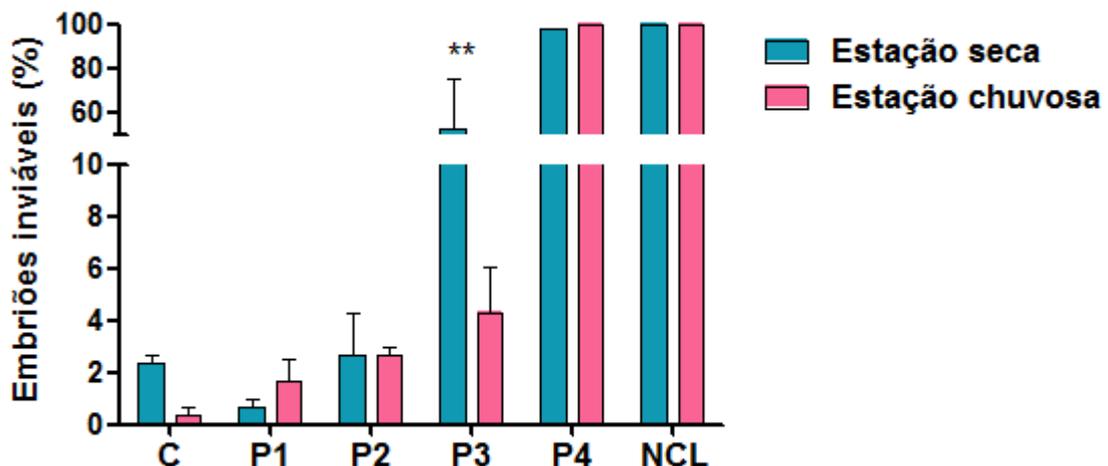
realizados foram de embriotoxicidade, toxicidade aguda, citotoxicidade, viabilidade celular, genotoxicidade e bioacumulação de elementos-traço.

4.3.1 Embriotoxicidade

Os resultados da exposição dos embriões expostos às amostras do rio Capibaribe podem ser observados na Figura 18. O percentual de inviabilidade dos embriões expostos às amostras de água dos pontos P1 e P2 foi em torno de 2 e 3%, respectivamente, tanto para as estações seca quanto chuvosa. Estatisticamente não houve diferença significativa entre os embriões expostos às águas dos pontos P1 e P2 quando comparados ao grupo controle negativo e entre eles.

Ao analisar os embriões expostos às águas dos pontos 3 e 4, na estação seca, pode-se observar um percentual de 53 e 98% de inviabilidade, respectivamente. No entanto, as amostras de água coletadas, na estação chuvosa, na cidade de Santa Cruz do Capibaribe (P4) apresentaram uma embriotoxicidade ainda mais elevada, ou seja, 100% dos embriões estavam inviáveis após a exposição. A análise da água coletada no ponto 3, durante a estação chuvosa, apresentou baixa inviabilidade embrionária, em torno de 5%.

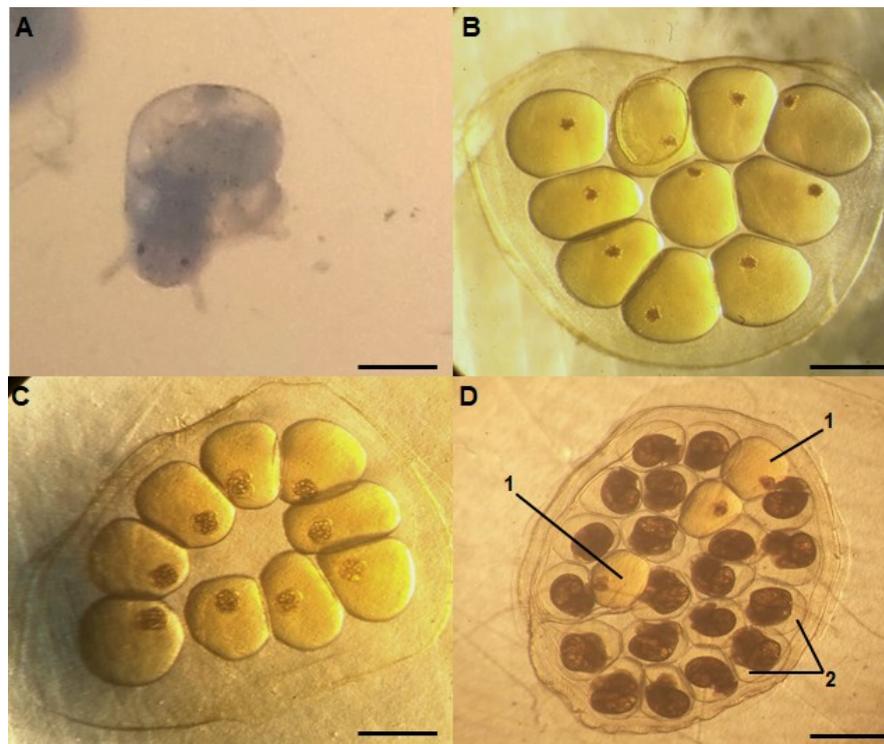
Figura 18 - Toxicidade das amostras da água do rio Capibaribe sobre embriões *Biomphalaria glabrata*. Onde (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadoinho; (P3) Toritama e (P4) Santa Cruz do Capibaribe; (NCL) niclosamida – controle positivo. Resultados significativos em comparação entre as estações ** p <0,01.



Fonte: A autora (2021).

Ao comparar P3 e P4 e os demais grupos (controle negativo, P1 e P2) observamos que esses dois grupos apresentaram diferença significativa em relação a todos os outros, com valores de $p < 0,05$. Estas alterações no *B. glabrata* podem ser visualizadas na Figura 19.

Figura 19 - Anormalidades em embriões de *Biomphalaria glabrata* expostos às amostras da água do rio Capibaribe. (A) embrião eclodido do grupo controle negativo. (B) embriões mortos após exposição à amostra de água do ponto 3 e 4. (C) embriões malformados após exposição à água do ponto 3 e 4. (D) desova contendo embriões mortos (1) e embriões em desenvolvimento normal (2). Barra de escala = 600 μm .



Fonte: A autora (2021).

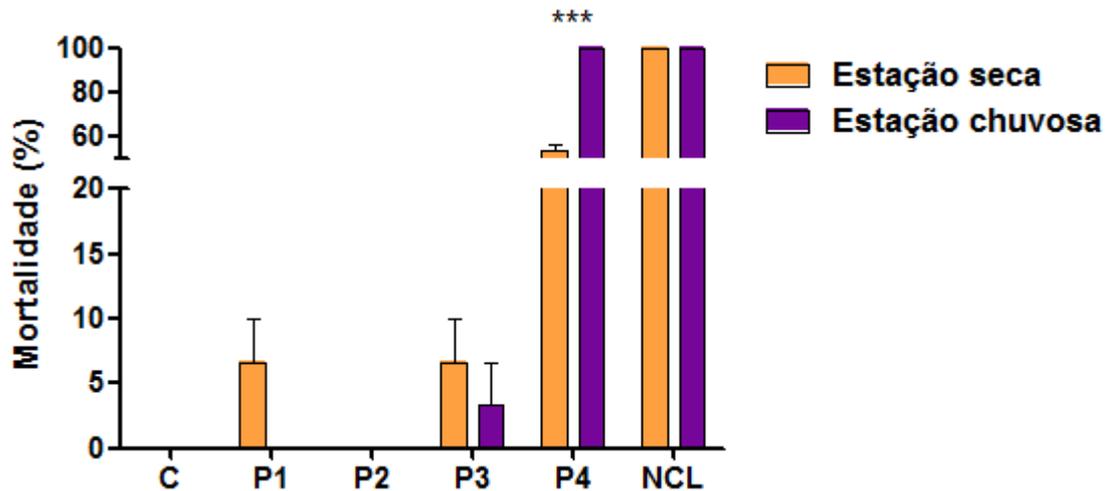
Observando os resultados da análise de amostras de águas afastadas das indústrias têxteis nota-se a ausência de embriotoxicidade tanto nas estações de seca quanto na estação chuvosa. Porém quando observamos o ponto 4, localizado em Santa Cruz do Capibaribe, nota-se um nível elevado de embriotoxicidade em ambas as estações estudadas. A utilização de células embrionárias para avaliar toxicidade de amostras é relevante, pois durante o desenvolvimento embrionário, os processos celulares e moleculares ocorrem para formar um organismo multicelular complexo, sendo considerada uma fase bastante sensível à presença de agentes químicos ou físicos (OLIVEIRA-FILHO; NAKANO; TALLARICO, 2017).

O desenvolvimento embrionário dos moluscos *B. glabrata* foi primeiramente estudado por Kawano, Okazaki e Ré (1992) e desde então tem sido alvo de diferentes estudos de toxicidade de substâncias químicas (SILVA et al., 2019; ARAÚJO et al., 2021), lodos industriais e domésticos (SIQUEIRA et al., 2020; 2021), nanopartículas (LIMA et al., 2019a), radiação ionizante (SILVA et al., 2018), análise de efluentes de estação de tratamento de efluentes (TALLARICO et al., 2014) e efeitos ecotoxicológicos de amostras de efluentes têxteis (GARCIA et al., 2021). Portanto, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que mesmo seguindo a legislação em vigor, os efluentes liberados no ambiente aquático apresentaram níveis elevados de toxicidade para os embriões de *B. glabrata*. No entanto, em seguida será apresentado estudos da toxicidade aguda sobre moluscos adultos de *B. glabrata*, bem como citotoxicidade, genotoxicidade e, por fim, os estudos das análises químicas dos sedimentos e da bioacumulação de moluscos adultos, para entendermos o tipo de impacto sofrido no ambiente aquático do rio Capibaribe.

4.3.2 Toxicidade aguda

Na Figura 20 pode-se verificar o percentual de mortalidade de moluscos adultos expostos às amostras do rio por 48 h. Amostras do P1 apresentaram-se com baixa mortalidade na estação seca com 7% de mortes dos caramujos, e com 100% de sobrevivência na estação chuvosa. Os moluscos expostos à água do ponto P2 a taxa de sobrevivência foi de 100%, em ambas as estações. Caramujos expostos a amostras de P3 também apresentaram uma taxa de mortalidade de 7% na estação seca, e de apenas 4% na estação chuvosa. A mortalidade dos moluscos adultos expostos à amostra de água de P4 apresentou a maior toxicidade (53% na estação seca e 100% na estação chuvosa) quando comparada aos outros pontos de coleta. Quando comparado ao controle negativo, este ponto foi o único que apresentou diferença estatística significativa entre as estações.

Figura 20 - Toxicidade aguda dos moluscos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos às amostras do rio Capibaribe. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama; (P4) Santa Cruz do Capibaribe e (NCL) niclosamida – controle positivo. Resultados significativos em comparação entre as estações *** $p < 0,001$.



Fonte: A autora (2021).

Os testes de toxicidade são utilizados para avaliar o perigo dos agentes tóxicos sobre a biota aquática. A resposta dos organismos vai depender das concentrações das substâncias e do tempo de exposição. O teste de toxicidade aguda é um dos mais utilizados na ecotoxicologia, pois fornece principalmente dados sobre mortalidade, sobrevivência após exposição em curto período, ou seja, o tipo de exposição utilizado neste estudo. Os moluscos adultos de *B. glabrata* foram utilizados para aferir efeitos biológicos das radiações ionizantes (SILVA et al., 2018), efeitos tóxicos dos defensivos agrícolas (SILVA et al., 2008; LIMA et al., 2019b) mostrando-se um modelo experimental sensível tanto à exposição a agentes físicos quanto químicos.

Ao observar trabalhos com outros espécimes de bioindicadores como, por exemplo, peixe-zebra expostos às amostras de águas coletados de efluentes de uma fábrica têxtil, exposto durante 4 dias, 1 g de peixe/1L água, resultou em uma taxa de mortalidade de 100% em relação ao controle negativo (ZHANG et al., 2012). Bhattacharya et al. (2016) expuseram moluscos gastrópodes de água doce, *Pila globosa*, às amostras de efluentes coletadas de indústrias de couro, na Índia. Após 96h de exposição observaram 80% de mortalidade, além de considerarem a concha dos moluscos sobreviventes mais frágeis do que as do grupo controle. Houve

também um aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), por causa da elevada concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs), isso geralmente acontece quando o organismo está sob estresse tentando se defender da ação de poluentes.

Pellegrini, Gorbi e Buschini (2020) ao avaliarem a toxicidade aguda de *Daphnia magna*, microcrustáceos de água doce, após 48h de exposição em amostras de águas do rio Po, província de Parma – Itália, observaram uma diferença significativa nos pontos considerados mais poluentes em relação aos menos poluentes, 90% e 20% de mortalidade, respectivamente. Esses pontos poluídos encontram-se em regiões de maiores impactos urbanos e industriais da região. Também apresentaram pH em torno de 7,8 e 8,0 e condutividade elétrica de 0,97 a 1,30 mS.cm⁻¹, dados esses que condizem com os achados no presente estudo, onde o ponto P3 e P4 apresentaram maiores valores de pH e CE juntamente com as maiores frequências de mortalidade dos caramujos adultos e na fase embrionária.

Methneni et al. (2021) avaliaram os organismos *D. magna* e *Vibrio fischeri*, este último uma bactéria marinha, após exposição aguda aos rios Khniss e Hamdoun, na Tunísia, ambos os rios estão próximos de descarga de águas residuais de indústrias têxteis e da zona urbana. E os autores constataram níveis tóxicos em ambos os organismos, onde *D. magna* apresentou imobilidade (EC₅₀ = 38% - concentração média efetiva capaz de produzir efeito adverso em 50% de espécimes expostos) diante do rio Khniss, e a *V. fischeri* diminuição da bioluminescência (EC₅₀ = 20,8%) diante do rio Hamdoun. Um estudo feito por Oliveira (2017) também avaliou esses dois organismos após exposições às amostras de águas do rio Capibaribe coletadas na cidade de Toritama, e tanto a *Daphnia* como a *Vibrio* apresentaram toxicidade nas concentrações da amostra diluídas em até 6,25% e 13,16%, respectivamente, ou seja, as amostras diluídas até essas concentrações (6 e 13%) apresentaram imobilidade/morte em mais de 10% dos organismos expostos. Dessa maneira, podemos compreender que rios que recebem o despejo de resíduos têxteis, tendem a apresentar variantes que aumentam a toxicidade aguda em organismos que habitam o sistema aquático. Dados que corroboram com os achados neste trabalho, principalmente no ponto de coleta P4.

Sabe-se que o cobre é uma substância utilizada em muitos lugares como moluscicida (TALLARICO et al. 2014), no fator de contaminação (FC) nós observamos as maiores concentrações de Cu na estação chuvosa, em sedimento

em suspensão (29,75) e sedimento de fundo de rio (12,35) para o P4, isso pode estar afetando a sobrevivência dos moluscos adultos nessa estação.

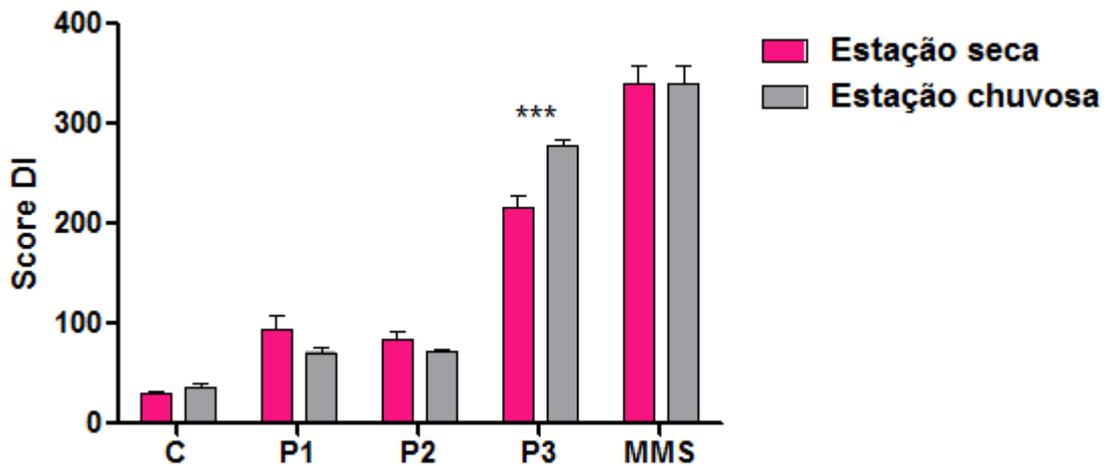
Como foi observado nos ensaios de toxicidade aguda que a cidade de Santa Cruz do Capibaribe (P4), ocorreu 100% de mortalidade dos moluscos quando expostos à água do rio no período de chuva, o teste de micronúcleo e ensaio do cometa neste ponto ficou inviabilizado para a estação chuvosa, dessa forma foi optado em não avaliar estatisticamente os dados da estação seca, já que ficaria inviável a comparação entre as estações.

4.3.3 Genotoxicidade: Ensaio cometa

Os hemócitos dos moluscos adultos foram analisados quanto a sua viabilidade celular, e foi observado que em todos os grupos amostrais as células apresentaram-se acima de 90% viabilidade, o que permitiu prosseguir com o Ensaio cometa. Levando em consideração que se as células apresentarem mais de 15% de inviabilidade, indicativo da fragmentação do DNA (células em necrose e apoptose), a realização do Ensaio cometa ficará inviável, devido ao fato da eletroforese não ocorrer de maneira correta (WACZUK et al., 2015; VACCHI et al., 2016).

Na Figura 21, pode-se observar que no ponto P3 a água provocou altos índices de danos ao DNA nos hemócitos do bioindicador, comprovando que neste ponto há um maior nível de contaminação. Por outro lado, as amostras de P2 e P1 apresentaram melhor qualidade da água. Os dados de P4 foram retirados desse ensaio por ser inviável a análise durante a estação chuvosa, por apresentar alta mortalidade.

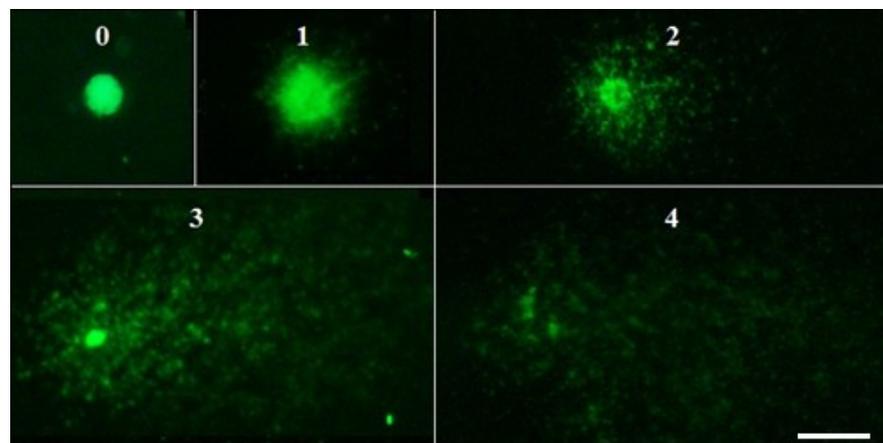
Figura 21 - Índice de danos no DNA em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (MMS) metanossulfonato de metila – controle positivo. Resultados significativos em comparação entre as estações *** $p < 0,001$.



Fonte: A autora (2021).

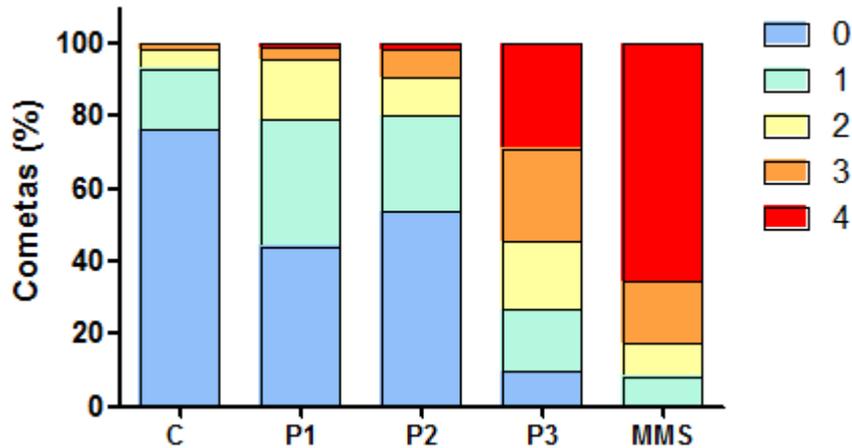
Através da fragmentação dos nucleóides e do comprimento da “cauda” do cometa, pode-se determinar os diferentes graus de danos ao DNA encontrados neste estudo (Figura 22). De acordo com a Figura 23, são mostradas as diferenças entre os graus de danos em cada amostra. O P1 e P2 apresentaram o grau 0 em maior quantidade, em torno de 44% e 54%, respectivamente. O P3 apresentou o grau 4 com 29% de dano, como o maior grau no DNA.

Figura 22 - Diferentes graus (0 a 4) de danos no DNA (nucleóides) de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos às amostras do rio Capibaribe. Barra de escala = 20 μm .



Fonte: A autora (2021).

Figura 23 - Frequência de graus de danos no DNA de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama e (MMS) metanossulfonato de metila – controle positivo.



Fonte: A autora (2021).

Moscas *Drosophila melanogaster* foram expostas a amostras do rio Capibaribe, e os resultados da análise da hemolinfa mostraram que a estação chuvosa foi mais genotóxica do que a estação seca, apresentando índice de dano (Score DI) entre 54 a 225 e 58 a 117, respectivamente, sugerindo que a utilização de produtos químicos, como os pesticidas, em torno da bacia do Capibaribe pode ser carregada pelas chuvas para o leito do rio, afetando assim o DNA das moscas (OLIVEIRA, 2019). Além disso, essas amostras de água foram classificadas como muito poluídas pelo CPRH (2017), após a análise dos parâmetros físico-químicos.

Kolarević et al. (2016) analisaram as células sanguíneas dos peixes *Alburnus alburnus* e *Alburnoides bipunctatus*, após a exposição às amostras de águas do rio Sava, maior afluente do rio Danúbio, no Sudeste da Europa, e foram observados em torno de 20 a 50% da intensidade da fluorescência nas caudas dos cometas, além disso os autores verificaram uma frequência de 2,9 e 3,4% de MN, e, através do biomarcador celular 8-oxoguanina (8-oxoG), constataram um aumento do estresse oxidativo, um dos responsáveis por gerar danos ao DNA (BANERJEE et al., 2014). Provavelmente a genotoxicidade do rio Sava está ligada ao fato de que ele recebe grandes quantidades de resíduos de atividades agrícolas, industriais e urbanas.

Peixes da espécie *Heteropneustes fossilis* foram expostos por 24 h ao efluente têxtil bruto (40% v/v), e os danos ao DNA foram analisados nas células do

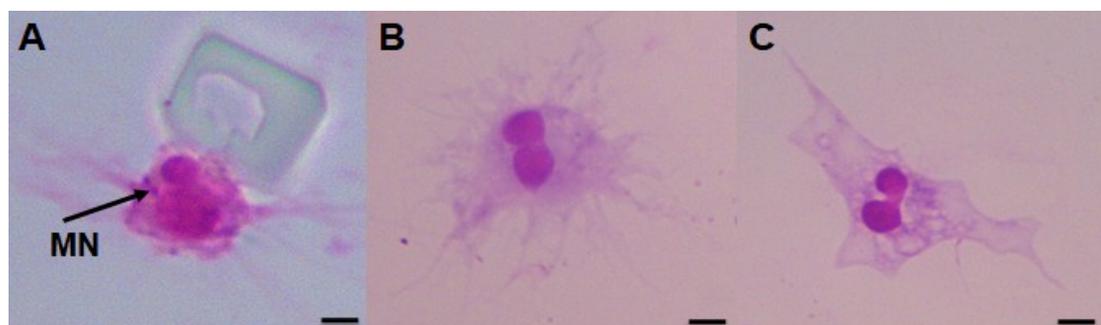
fígado, que apresentaram uma maior frequência de dano nível 2, com 47,29%, tendo um aumento de 2,5 vezes em comparação ao controle. A frequência de MN ficou em torno de 8,68%, sendo também detectadas células binucleadas e com presença de vacúolos. Os elementos-traço e outros produtos tóxicos presentes nos efluentes têxteis foram considerados a causa pela formação das anormalidades celulares. O aumento das atividades enzimáticas de SOD e CAT, indicaram um nível elevado de EROs, já que durante a exposição as amostras contaminadas dessas enzimas são estimuladas constantemente (BANERJEE et al., 2014).

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo onde o ponto P3 apresentou maiores frequências de MN, binucleações e apoptose, concomitantemente também foi o que mais expressou graus de dano no nível 3 e 4, corroborando com o fato de que P3 encontra-se próximo a atividades industriais têxteis, podemos sugerir que suas águas podem conter uma maior carga de agentes poluentes com ação mutagênica e genotóxica, como detergentes e elementos-traço, proporcionando assim um maior dano ao DNA.

4.3.4 Citotoxicidade em hemócitos de *B. glabrata*

As alterações na morfologia das células hemocitárias encontradas nos moluscos após a exposição aguda às amostras de águas do rio Capibaribe foram identificadas como micronúcleo (MN), binucleação (BN) e apoptose (AP), Figura 24.

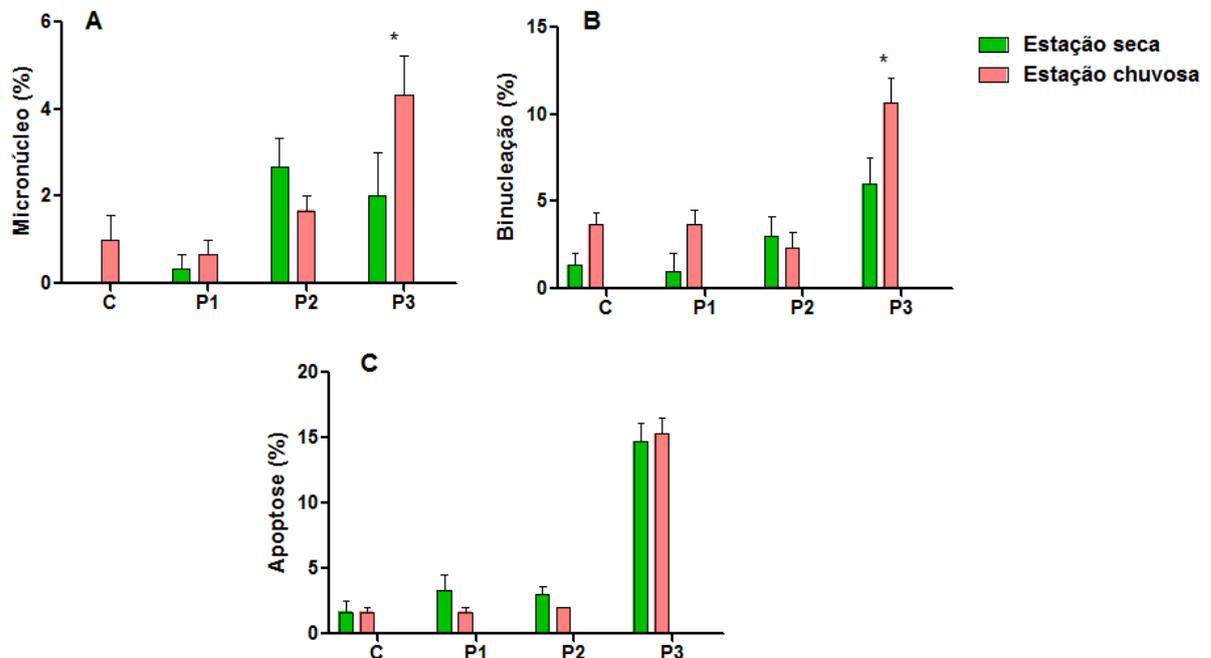
Figura 24 - Anormalidades encontradas nos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* durante a leitura das lâminas após exposição de amostras do rio Capibaribe (1000x objetiva). (A) Micronúcleo. (B) Binucleação. (C) Hemócito com apoptose e binucleação. Barra de escala = 10 μ m.



Fonte: A autora (2021).

A citotoxicidade dos hemócitos demonstrou um crescimento linear, a partir de P1, P2 e P3. Apresentando uma diferença significativa em P3, para micronúcleo e binucleação, Figura 25 A e B, respectivamente, quando comparada entre as estações seca e chuvosa. Nas alterações de apoptose (Figura 25 C) não houve diferença significativa em relação às estações. Esses dados reforçam a influência das indústrias têxteis presentes nessa região, onde provavelmente há descarga de corantes e detergentes na água do rio.

Figura 25 - Alterações em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após a exposição às amostras do rio Capibaribe. Onde A - Micronúcleo. B - Binucleação. C - Apoptose. (C) controle negativo; (P1) Recife; (P2) Salgadinho; (P3) Toritama. Resultados significativos em comparação entre as estações * $p < 0,05$.



Fonte: A autora (2021).

Sabe-se que o organismo dos seres vivos tende a remover as células danificadas, seja células com MN, binucleação ou apoptose, mais rapidamente do que as células não danificadas. Essa modificação rápida na população das células acarreta a eliminação eficiente de células mortas e danificadas para manter o tecido saudável capaz de continuar a executar normalmente as funções fisiológicas do organismo (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; OBIAKOR et al., 2012). Portanto, pode-se entender que a frequência de micronúcleo apresentada neste trabalho expressa

os danos cromossômicos dos moluscos expostos à água com contaminantes da indústria têxtil.

A ação dos rejeitos, tais como petróleo, fenóis, elementos-traço, por exemplo, podem induzir a produção dos micronúcleos nas células dos organismos. E a frequência de MN pode variar significativamente, dependendo da natureza do agente tóxico e da espécie em estudo, e essas diferenças podem estar relacionadas ao mecanismo de ação do agente xenobiótico e/ou à velocidade do processo de hematopoiese do organismo, como relatado anteriormente (SCHULTZ; BENINCÁ, 2016; SILVA et al., 2016).

Trabalhos realizados com outras espécies de bioindicadores demonstraram que a análise de toxicidade celular é uma técnica sensível e robusta para realização da monitoração de ambientes aquáticos. As águas do rio Corrente (Pedro II – Piauí/Brasil), localizado em região próxima da agricultura familiar, resíduos urbanos e da indústria automotiva, foram analisadas quanto ao seu nível de citotoxicidade por meio da exposição das células de *Allium cepa* (popularmente conhecido como cebola), durante o período chuvoso e seco. As células apresentaram um aumento de alterações de binucleação e MN. Na estação chuvosa verificou uma frequência de 1,7 (BN) e 1,8 (MN) e na estação seca a frequência de 2,2 (BN) e 3,3 (MN) (BATISTA et al., 2016). Os micronúcleos são fragmentos acêntricos ou tardios, que são excluídos do próprio núcleo durante a mitose, as células binucleadas correspondem ao processo de divisão mitótica atrasada, formando células com a presença de dois ou mais núcleos (GUPTA; AHMAD, 2012; SILVA et al., 2013). A presença desses dois tipos de aberrações nucleares tem-se tornado importante biomarcadores de efeitos decorrentes da presença de compostos mutagênicos. Estes resultados corroboram com os achados no presente trabalho.

Estressores ambientais podem induzir o processo de apoptose nas células dos organismos. A apoptose, ou morte celular programada, é um processo de morte que resulta em uma cascata de eventos bioquímicos característicos, resultando em mudanças morfológicas e na morte da célula. As células em apoptose exibem vacúolos no citoplasma, encolhimento celular e fragmentação do material genético. Esse processo desempenha um importante papel tanto no desenvolvimento normal como na homeostasia dos organismos multicelulares (BROWN; YANG; RAY, 2014). Neste trabalho, a apoptose de hemócitos de moluscos expostos a água do ponto P3, região de Toritama, apresentou o maior índice de apoptose celular, indicando a

maior toxicidade entre os pontos estudados. A formação de EROs, é considerada como uma das principais ações provocada pela poluição de agentes xenobióticos, seja por resposta celular à presença desses agentes ou como efeito secundário da inflamação induzida pelas partículas químicas (COLLINS; EL YAMANI; DUSINSKA, 2017; NAPIERSKA et al., 2018). As EROs atacam o DNA, causam a modificação de partes de carboidratos e bases nitrogenadas por oxidação, nitração, metilação ou desaminação, finalmente levando a célula à morte (apoptose) (SHUKLA et al., 2013).

Siqueira et al. (2020) observaram a frequência de aproximadamente 15% de células binucleadas e MN, e 20% de células em apoptose de caramujos adultos da espécie *B. glabrata*, após exposição aguda de 48 h ao lodo industrial (SRM 2782), a uma concentração de 500 mg L⁻¹, sugerindo que os possíveis efeitos deletérios sobre o DNA dos hemócitos podem estar correlacionados com a presença de elementos químicos tóxicos, como os elementos-traço. A utilização de elementos-traço, tais como cobre, chumbo, cromo e níquel em indústrias têxteis como agentes oxidantes para remoção de tinturaria, tem provocado modificações no processo de reparo do DNA (MEIRELES, 2013). Em consequência disso, as águas que recebem efluentes têxteis, podem apresentar propriedades genotóxicas e potencial mutagênico relacionado à presença de produtos químicos (VACCHI et al., 2016), o que explicaria o fato do ponto P3, ser o que mais apresentou alterações na morfologia dos hemócitos em nosso estudo.

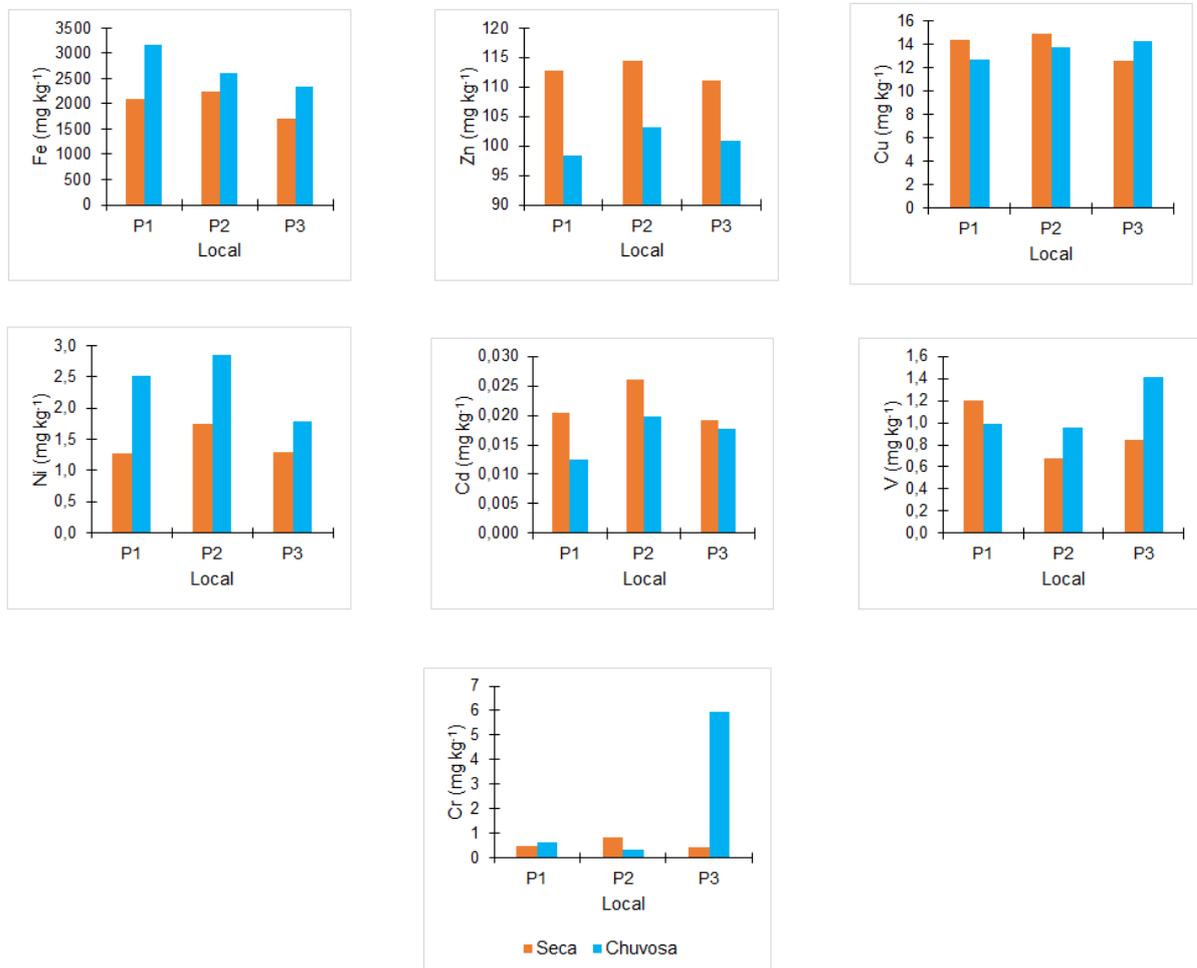
4.3.5 Bioacumulação de elementos-traço

As quantificações de elementos-traço, após a exposição de amostras de água do rio Capibaribe em moluscos adultos (Figura 26), demonstraram uma variação na concentração dos elementos-traço em relação as estações. Elementos como Fe e Ni apresentaram concentrações maiores na estação chuvosa, Zn e Cd na estação seca, e os demais elementos variaram de acordo com os pontos de amostragem. Em P3, identificou-se o valor de Cr (5,94 mg kg⁻¹) muito elevado na estação chuvosa, diferentemente dos demais pontos (P1 0,64 mg kg⁻¹ e P2 0,35 mg kg⁻¹).

A falta de informações na literatura para comparar moluscos *B. glabrata* em estudos de bioacumulação dificultou a discussão sobre a relação dos efeitos de substâncias químicas compostas por elementos-traço nesses invertebrados.

O acúmulo de elementos-traço nos sedimentos e na água concede à alguns organismos aquáticos a capacidade de bioacumular esses elementos e transportá-los através da cadeia alimentar. O molusco gastrópode de água doce, *Bellamya bengalensis*, presente no rio Churni (Índia) foi avaliado quanto a bioacumulação de cromo, após a análise por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, e foi detectado uma concentração de $0,037 \text{ mg kg}^{-1}$ (SANYAL et al., 2015), essas águas estão situadas em regiões que recebem efluentes de fábricas têxteis. Cromo é bastante utilizado em produção de pigmentos de corantes têxteis (DEEPALI; GANGWAR, 2010).

Figura 26 - Quantificação dos elementos-traço analisados após exposição dos moluscos *Biomphalaria glabrata* às amostras da água do rio Capibaribe. (P1) Recife; (P2) Salgadinho e (P3) Toritama.



Fonte: A autora (2021).

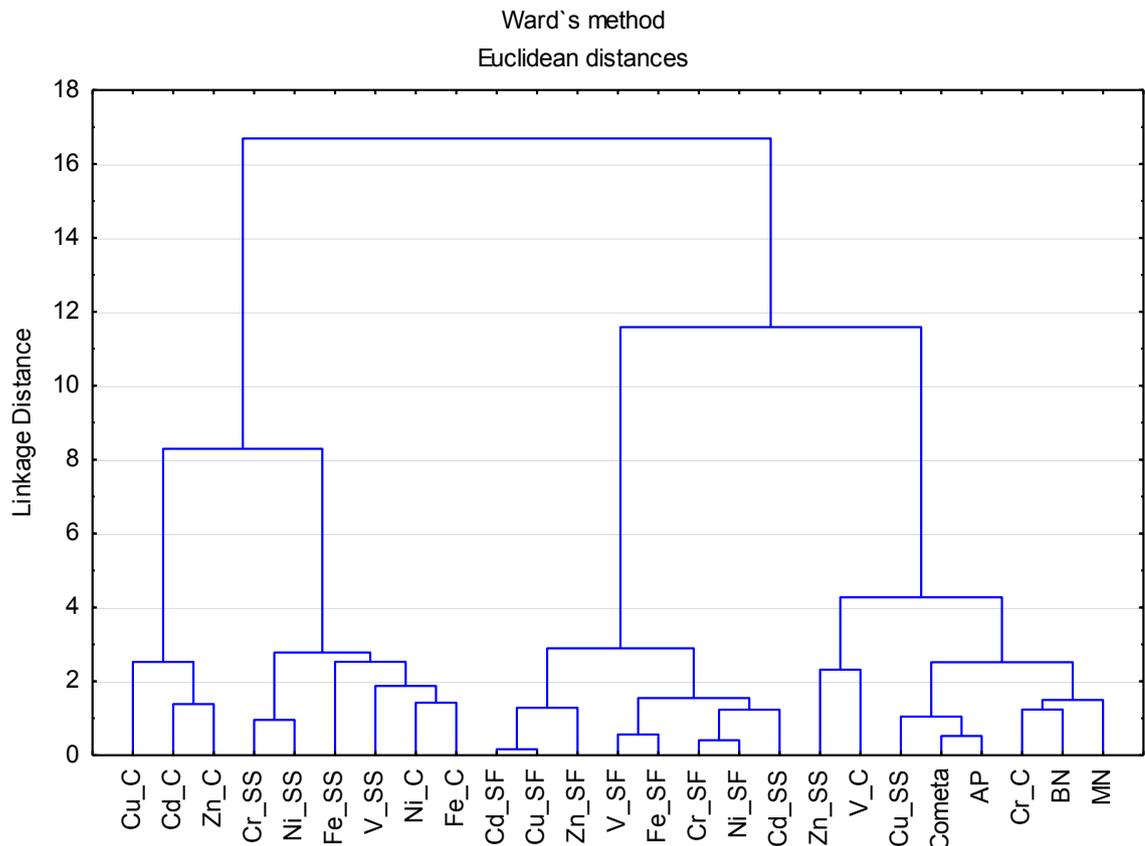
4.4 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS

Utilizou-se de análise de discriminante a partir de dendrograma construído pelo método de ligação de Ward's com o objetivo de agrupar os resultados obtidos nos estudos das quantificações dos elementos-traço com os bioensaios nos moluscos *B. glabrata*. A análise de agrupamento considerou a semelhança que existe entre os vetores, o que possibilitou identificar os agrupamentos que acontecem entre os testes químicos e biológicos.

Na Figura 27 observamos a distribuição dos grupos estabelecidos no dendrograma, os resultados obtidos para quantificação de cromo no caramujo

(Cr_C), binucleação (BN) e micronúcleo (MN) estão fortemente agrupados, bem como, os resultados para cobre em sedimento em suspensão (Cu_SS), ensaio cometa (Cometa) e apoptose (AP).

Figura 27 - Dendrograma sintetizando o agrupamento dos resultados das análises dos elementos-traço e os bioensaios de acordo com suas semelhanças. (C) Caramujo; (SS) Sedimento em suspensão; (SF) Sedimento de fundo de rio; (AP) Apoptose; (BN) Binucleação; (MN) Micronúcleo.



Fonte: A autora (2021).

Ao apresentar-se esses dados, pôde-se dizer que os caramujos apresentaram mutagenicidade e genotoxicidade relacionada principalmente com Cr e Cu.

5 CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados com o caramujo *Biomphalaria glabrata* e a análise da água do rio Capibaribe, conclui-se que:

- Na análise dos parâmetros físico-químicos, a água do rio Capibaribe ao longo do seu percurso apresentou valores de pH dentro do limite de uso, porém os valores de condutividade elétrica mostraram-se acima do aceitável, tanto na estação chuvosa como na estação seca;
- Após as análises químicas dos sedimentos, o fator de contaminação dos sedimentos e o índice de carga de poluição indicaram que o P4 está altamente poluído;
- As quantificações de elementos-traço mostraram níveis elevados de Cu nos sedimentos em suspensão, para o P3, na estação chuvosa; também elevada concentração de Zn, Ni e Cr em P2, provavelmente devido a ação antropogênica;
- Nos sedimentos de fundo P3 mostrou-se em concentrações muito mais elevadas que os demais pontos na estação seca;
- O ensaio de embriotoxicidade e toxicidade aguda com os embriões e indivíduos adultos do molusco *B. glabrata*, demonstraram serem técnicas sensíveis para serem utilizadas na ecotoxicologia,
- O ponto P4 apresentou maior índice de toxicidade aquática com 100% da mortalidade tanto para os embriões quanto para os moluscos adultos no período chuvoso, corroborando os dados achados em FC e PLI;
- Com relação às alterações morfológicas, pode-se visualizar a presença de células com micronúcleo, binucleações e apoptose, onde os resultados indicaram que essas alterações podem ser utilizadas para indicar a toxicidade em ambientes aquáticos contaminados por efluentes da indústria têxtil;
- O Ensaio cometa em *B. glabrata* se mostrou um teste eficaz e robusto para avaliar a ação dos possíveis agentes xenobióticos que estão presentes nas águas do rio Capibaribe.
- A bioacumulação em moluscos mostrou a capacidade desses animais em absorver elementos como o Cr;

- E por fim, ao relacionar a quantificação dos elementos-traço com os bioensaios, observamos forte agrupamento entre o cobre detectado nos sedimentos em suspensão, Ensaio do cometa e AP; bem como, o cromo nos moluscos e alterações morfológicas de BN e MN.

REFERÊNCIAS

ALVES, P. R. L.; NIEMEYER, J. C.; CARDOSO, E. J. B. N. The Use of Non-standardized Invertebrates in Soil Ecotoxicology. **Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models**, v. 32, p. 1, 2017.

AMARAL, R. S.; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas. **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. Ministério da Saúde, Brasília – DF, 2008, 180 p.

ANDARANI, P.; ALIMUDDIN, H.; SUZUKI, R.; YOKOTA, K.; INOUE, T. Zinc contamination in surface water of the Umeda River, Japan. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, v. 623, p. 012064, 2021.

APAC - AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMAS. **Bacias Hidrográficas**. Disponível em: <<http://200.238.107.184/bacias-hidrograficas/40-bacias-hidrograficas/193-bacia-do-rio-capibaribe>>. Acesso em: 13 mai. 2021.

ARAUJO, F. V. D.; VIEIRA, L.; JAYME, M. M. A.; NUNES, M. C.; CORTÊS, M. Avaliação da qualidade da água utilizada para irrigação na bacia do Córrego Sujo, Teresópolis, RJ. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 23, p. 380-385, 2015.

ARAÚJO, H. D.; MELO, A. M.; SIQUEIRA, W. N.; MARTINS, M. C.; AIRES, A. L.; ALBUQUERQUE, M. C.; SILVA, N. H.; LIMA, V. L. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Tropica**, v. 188, p. 132-137, 2018.

ARAÚJO, H. D.; SILVA, H. A. M. F.; SIQUEIRA, W. N.; SANTOS, V. H.; LIMA, M. V.; SILVA JÚNIOR, J. G. S.; SILVA, N. H.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; MELO, A. M. M. A.; AIRES, A. L.; COELHO, L. C. B. B. Sublethal concentrations of usnic acid potassium salt impairs physiological parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata: Planorbidae) infected and not infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 222, p. 106067, 2021.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIĘCKA, M. The Comet assay in insects—status, prospects and benefits for science. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 67-76, 2016.

AYADI, I.; SOUISSI, Y.; JLIASSI, I.; PEIXOTO, F.; MNIF, W. Chemical synonyms, molecular structure and toxicological risk assessment of synthetic textile dyes: a critical review. **Journal of Developing Drugs**, v. 5, p. 2, 2016.

AZAMAN, F.; JUAHIR, H.; YUNUS, K.; AZID, A.; KAMARUDIN, M. K. A.; TORIMAN, M. E.; MUSTAFAA, A. D.; AMRANA, M. A.; HASNAMA, C. N. C.; SAUDIA, A. S. M. Heavy metal in fish: analysis and human health—a review. **Jurnal Teknologi**, v. 77, p. 61–69, 2015.

BANERJEE, P.; SARKAR, S.; DEY, T. K.; BAKSHI, M.; SWARNAKAR, S.; MUKHOPADHAYAY, A.; GHOSH, S. Application of isolated bacterial consortium in UMBR for detoxification of textile effluent: comparative analysis of resultant oxidative stress and genotoxicity in catfish (*Heteropneustes fossilis*) exposed to raw and treated effluents. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 1073–1085, 2014.

BARŠIENĖ, J.; BUTRIMAVIČIENĖ, L.; MICHAILOVAS, A.; GRYGIEL, W. Assessing the environmental genotoxicity risk in the Baltic Sea: frequencies of nuclear buds in blood erythrocytes of three native fish species. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 4078, 2015.

BATISTA, N. J.; CAVALCANTE, A. A. C. M., OLIVEIRA, M. G.; MEDEIROS, E. C.; MACHADO, J. L.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, J. F.; SANTOS, C. E.; DUARTE, A.; SILVA, F. R.; SILVA, J. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere**, v. 164, p. 134-141, 2016.

BELTRAME, T. F.; BELTRAME, A. F.; LHAMBY, A. R.; PIRES, V. K. Wastewater, solid waste and environmental education: a discussion about the subject. **Revista Eletrônica em Gestão Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, p. 283-294, 2016.

BEZERRA, J. M.; BATISTA, R. O.; SILVA, P. C. M. Caracterização do processo de poluição dos sedimentos do rio Apodi-Mossoró no trecho urbano de Mossoró-RN. **Sociedade & Natureza**, v. 30, p. 108-126, 2018.

BHATTACHARYA, P.; SWARNAKAR, S.; MUKHOPADHYAY, A.; GHOSH, S. Exposure of composite tannery effluent on snail, *Pila globosa*: A comparative assessment of toxic impacts of the untreated and membrane treated effluents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 126, p. 45-55, 2016.

BIRK, S.; BONNE, W.; BORJA, A.; BRUCET, S.; COURRAT, A.; POIKANE, S.; SOLIMINI, A.; BUND, W. V.; ZAMPOUKAS, N.; HERING, D. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 31-41, 2012.

BISSCHOPS, I.; SPANJERS, H. Literature review on textile wastewater characterisation. **Environmental technology**, v. 24, p. 1399-1411, 2003.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205-213, 2011.

BORGES, Simone Soares de Oliveira. **Estratégias analíticas para a determinação direta de alumínio, chumbo e cobre em amostras de bebidas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite**, 2016. 74 p. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

BOUR, A.; MOUCHET, F.; SILVESTRE, J.; GAUTHIER, L.; PINELLI, E. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 764-777, 2015.

BROWN, D. A.; YANG, N.; RAY, S. D. Apoptosis. **Encyclopedia of Toxicology**, 3ª edição, p. 287-294, 2014.

BUSCIO, V.; LÓPEZ-GRIMAU, V.; ÁLVAREZ, M. D.; GUTIÉRREZ-BOUZÁN, C. Reducing the environmental impact of textile industry by reusing residual salts and water: ECUVal system. **Chemical Engineering Journal**, v. 373, p. 161-170, 2019.

CAMARGO, F. P.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S.

Removal of toxic metals from sewage sludge through chemical, physical, and biological treatments—a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, p. 1-11, 2016.

CANTINHA, R. S.; BORRELY, S. I.; NAKANO, E.; AMARAL, A.; SILVA, L. R.; MELO, A. M. M. A. Effects of High dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal of Low Radiation**, v. 4, p. 245-251, 2010.

CANTINHA, Rebeca da Silva. **Estudo da resposta do caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) frente a estímulos ambientais estressores, com enfoque na proteína HSP70**, 2012. 103 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CANTINHA, Rebeca da Silva. **Influência da radiação gama de alta taxa de dose na sobrevivência e na reprodução de *Biomphalaria glabrata***, 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

CONCEIÇÃO, Adreani Araujo da. **Influência das condições ambientais sobre os traços funcionais de invertebrados aquáticos em áreas úmidas subtropicais**. 2019. 65 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

CARTER, S.; FISHER, A. S.; HINDS, M. W.; LANCASTER, S.; MARSHALL, J. Atomic spectrometry update. Review of advances in the analysis of metals, chemicals and materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 1814-1869, 2013.

CARVALHO, O. D. S.; MENDONÇA, C. L. F. D.; MARCELINO, J. M. D. R.; PASSOS, L. K. J.; FERNANDEZ, M. A.; LEAL, R. D. S.; CALDEIRA, R. L.; SCHOLTE, R. G. C.; CARMO, E. H.; MESQUITA, S. M.; THIENGO, S. C. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. 1-9, 2018.

CARVALHO, O. S.; MENDONÇA, C. L. F.; TELES, H. M. S.; FINAU, J.; CALDEIRA, R. L. SCHOLTE, R. G. C.; MESQUITA, S. G. Moluscos hospedeiros intermediários

de *Schistosoma mansoni* do Brasil. **Belo Horizonte: Instituto Rene Rachou/Fundação Oswaldo Cruz**, 2020, 116p.

CARVALHO, O. S.; PASSOS, L. K. J.; MENDONÇA, C. L. G. F. D.; CARDOSO, P. C. M.; CALDEIRA, R. L. Moluscos brasileiros de importância médica. In ***Moluscos brasileiros de importância médica***, 2014, 94 p.

CAVALCANTI, M. G. S.; MENDONÇA, A. M. B.; DUARTE, G. R.; BARBOSA, C. C. G. S.; DE CASTRO, C. M. M. B.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, v. 43, p. 285-291, 2012.

CHEN, F.; ZHU, J.; YANG, Y.; WANG, L. Assessing environmental impact of textile production with water alkalization footprint. **Science of The Total Environment**, v. 719, p. 137522, 2020.

COLLINS, A.; EL YAMANI, N.; DUSINSKA, M. Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 69-76, 2017.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; GAIVÃO, I.; BRUNBORG, G.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; ŠTĚTINA, R. The Comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, p.143–151, 2008.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Resolução no. 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 09 mai. 2021.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. **Resolução no. 454, de 1 de novembro de 2012**. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2012/res_con

ama_454_2012_materialserdragadoemaguasjurisdicionaisbrasileiras.pdf. Acesso em: 12 abr. 2021.

CPRH - AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. **Diagnóstico ambiental das lavanderias de Toritama**. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/toritama.pdf>. Acesso em: 17 abr, 2021. 48 p., 2005.

CPRH - AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. **Instrução Normativa 07/2014**. Estabelece os valores de referência da qualidade do solo (VRQ) do Estado de Pernambuco quanto à presença de substâncias químicas para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=279789> Acessado em: 23 set, 2021.

CPRH – AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. **Relatório de monitoramento da qualidade da água de bacias hidrográficas do estado de Pernambuco em 2017**. Disponível em: http://www2.cprh.pe.gov.br/wp-content/uploads/2021/02/K_Relat17-CB_3.3.pdf. Acesso em: 24 mai, 2021.

DEEPALI, K. K.; GANGWAR, K. Metals concentration in textile and tannery effluents, associated soils and ground water. **New York Science Journal**, v. 3, p. 82-89, 2010.

DEUTSCHMANN, B.; KOLAREVIC, S.; BRACK, W.; KAISAREVIC, S.; KOSTIC, J.; KRACUN-KOLAREVIC, M.; LISKA, I.; PAUNOVIC, M.; SEILER, T-B.; SHAO, Y.; SIPOS, S.; SLOBODNIK, J.; TEODOROVIC, I.; VUKOVIC-GACIC, B.; HOLLERT, H. Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. **Science of The Total Environment**, v. 573, p. 1441-1449, 2016.

FABRIN, T. M. C.; DIAMANTE, N. A.; MOTA, T. F. M.; CASTILHOS G. N.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J. Performance of biomarkers metallothionein and ethoxyresorufin O-deethylase in aquatic environments: A meta-analytic approach. **Chemosphere**, v. 205, p. 339–349, 2018.

FIGUEIREDO, Eliane Souza. **Efeitos tóxicos dos extratos aquosos e hidralcoólicos de Indigofera Suffruticosa sobre *Biomphalaria glabrata*, cercarias de *Schistosoma mansoni* e larvas de *Artemia salina***, 2011. 88 p. Tese

(Doutorado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; CAVALCA, I. P. O.; FONSECA, F. Y.; CAMILLI, L.; RODRIGUES, V. S.; BARDINI JUNIOR, C.; FERREIRA, J. R.; BACCHI, M. A. Characterizing suspended sediments from the Piracicaba River Basin by means of k_0 – INAA. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 622, p. 479 - 483, 2010.

FRANSOZO, A.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. **Zoologia dos Invertebrados**. 1º ed. São Paulo, Editora: Roca. 2016. 716 p.

GALLOWAY, Tamara. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 606–613, 2006.

GARCIA, V. S. G.; TALLARICO, L. F.; ROSA, J. M.; SUZUKI, C. F.; ROUBICEK, D. A.; NAKANO, E.; BORRELY, S. I. Multiple adverse effects of textile effluents and reactive Red 239 dye to aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-13, 2021.

GRAZEFTE, V. S.; TALLARICO, L. F., PINHEIRO, A. S.; KAWANO, T.; SUZUKI, M. F.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 654, p. 58-63, 2008.

GUPTA, A. K.; AHMAD, M. Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of refinery waste effluent using plant, animal and bacterial systems. **Journal of hazardous materials**, v. 201, p. 92-99, 2012.

HABIB, M. R.; MOHAMED, A. H.; OSMAN, G. Y.; MOSSALEM, H. S.; EL-DIN, A. T. S.; CROLL, R. P. *Biomphalaria alexandrina* as a bioindicator of metal toxicity. **Chemosphere**, v. 157, p. 97–106, 2016.

HALDAR, K.; KUJAWA-ROELEVELD, K.; DEY, P.; BOSU, S.; DATTA, D. K.; RIJNAARTS, H. H. Spatio-temporal variations in chemical-physical water quality parameters influencing water reuse for irrigated agriculture in tropical urbanized deltas. **Science of the Total Environment**, v. 708, p. 134559, 2020.

HAKANSON, L. An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. **Water research**, v. 14, p. 975-1001, 1980.

HALL, C. M.; RHIND, S. M.; WILSON, M. J. The potential for use of gastropod molluscs as bioindicators of endocrine disrupting compounds in the terrestrial environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, p. 491-497, 2009.

HUSSAIN, T.; WAHAB, A. A critical review of the current water conservation practices in textile wet processing. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 806-819, 2018.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. Geneva: ISO, 2005, 66 p.

JADHAV, J. P.; KALYANI, D. C.; TELKE, A. A.; PHUGARE, S. S.; GOVINDWAR, S. P. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 165–173, 2010.

KAWANO, T.; NAKANO, E.; WATANABE, L. C. Estudo do Desenvolvimento Embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**: 20. ed. Rio de Janeiro, Editora: FIOCRUZ, 2008, 347 p.

KAWANO T.; OKAZAKI K.; RÉ L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, p. 25-32, 1992.

KHAN, F. R.; BURY, N. R.; HOGSTRAND, C. Copper and zinc detoxification in *Gammarus pulex* (L.). **Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 822–832, 2012.

KOLAREVIĆ, S.; ABORGIBA, M.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; KOSTIĆ, J.; SIMONOVIĆ, P.; SIMIĆ, V.; MILOŠKOVIĆ, A.; REISCHER, G.; FARNLEITNER, A.; GAČIĆ, Z.; MILAČIČ, R.; ZULIANI, T.; VIDMAR, J.; PERGAL, M.; PIRIA, M.; PAUNOVIĆ, M.; VUKOVIĆ-GAČIĆ B. Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. **PloS one**, v. 11, p. e0162450, 2016.

KRISTOFF, G.; BARRIONUEVO, D. C.; CACCIATORE, L. C.; GUERRERO, N. R. V.; COCHÓN, A. C. In vivo studies on inhibition and recovery of B-esterase activities in *Biomphalaria glabrata* exposed to azinphos-methyl: analysis of enzyme, substrate and tissue dependence. **Aquatic Toxicology**, v. 112, p. 19-26, 2012.

KRUG, F. J. NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de absorção atômica Parte 2. Atomização eletrotérmica em forno grafite. **Disciplina Métodos Instrumentais de Análise Química**, Universidade de São Paulo, 2007, 23 p.

KRUG, F. J.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrômetro de absorção atômica Parte1. Fundamentos e atomização com chama. **Disciplina Métodos Instrumentais de Análise Química**, Universidade de São Paulo, 2004, 40 p.

LIMA, Daniel Pandilha de. **Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Amazônia, Brasil**, 2013. 147 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2013.

LIMA, Maíra de Vasconcelos. **Avaliação da toxicidade de suspensões de pontos quânticos em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)**, 2017. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

LIMA, M. V.; PEREIRA, M. I. A.; CABRAL FILHO, P. E.; SIQUEIRA, W. N.; SILVA, H. A. M. F.; FRANÇA, E. J.; SANTOS, B. S.; MELO, A. M. M. A.; FONTES, A. Studies on Toxicity of Suspensions of CdTe *Quantum Dots* to *Biomphalaria glabrata* Mollusks. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 38, p. 2128-2136, 2019a.

LIMA, M. V.; SIQUEIRA, W. N.; SILVA, H. A. M. F.; LIMA FILHO, J. M.; DE FRANÇA, E. J.; MELO, A. M. M. A. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 3350-3356, 2019b.

LLANOS-RIVERA, A.; CASTRO, L. R.; SILVA, J.; BAY-SCHMITH, E. A new developmental toxicity test for pelagic fish using Anchoveta (*Engraulis ringens* J.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, p. 23-28,

2009.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: **Mammalian cell viability**. Humana Press, p. 7-12, 2011.

LOUREIRO, R. C.; HEPP, L. U. Stream contamination by trace elements: biota incorporation and phytoremediation. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 32, e201, 2020.

ŁUCZYŃSKA, J.; PASZCZYK, B.; ŁUCZYŃSKI, M. J. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 60–67, 2018.

LV, Y.; WEI, Y.; ZHOU, J.; XUE, K.; GUO, Y.; LIU, Y.; JU, A.; WU, B.; ZHAO, F.; CHEN, C.; XIONG, J.; LI, C.; GU, H.; CAO, Z.; JI, J. S.; SHI, X. Human biomonitoring of toxic and essential metals in younger elderly, octogenarians, nonagenarians and centenarians: Analysis of the Healthy Ageing and Biomarkers Cohort Study (HABCS) in China. **Environment international**, v. 156, p. 106717, 2021.

LYRA, Denilson Tenorio de. **Determinação de elementos químicos de solos e sedimentos em suspensão para monitoração da qualidade ambiental de manguezal de Pernambuco**, 2016. 101 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

MARKERT, Bernd. From biomonitoring to integrated observation of the environment- The multi-markered bioindication concept. **Ecological Chemistry and Engineering. S**, v. 15, p. 315–333, 2008.

MARTINS, R. O.; BRAIT, C. H. H.; SANTOS, F. F. D. Avaliação do teor de metais pesados e de parâmetros físico-químicos da água e sedimento do lago Bonsucesso, Jataí-GO. **Revista Eletrônica do Curso de Geografia - UFG/REJ**, p. 88-92, 2017.

MASINDI, V.; MUEDI, K. L. Environmental contamination by heavy metals. **Heavy metals**, v. 10, p. 115-132, 2018.

MEDEIROS-SOUSA, A. R.; OLIVEIRA-CHRISTE, R.; CAMARGO, A. A.; SCINACHI, C. A.; MILANI, G. M.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D.; CERETTI-JUNIOR, W.;

MARRELLI, M. T. Influence of water's physical and chemical parameters on mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages in larval habitats in urban parks of Sao Paulo, Brazil. **Acta tropica**, v. 205, p. 105394, 2020.

MEHARI, A. K.; WONDIE, A.; MINGIST, M.; VIJVERBERG, J. Spatial and seasonal variation in the macro-invertebrates and physico-chemical parameters of the Enfranz River, Lake Tana sub-basin (Ethiopia). **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 14, p. 304–312, 2014.

MEIRELES, Gabriela. **Avaliação eco/genotóxica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15**, 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, São Paulo, 2013.

MÉLO, Julyanne Torres Bezerra de. **Moluscos terrestres *Littoraria angulifera* e *Melampus coffea* como biomonitorios da qualidade ambiental de manguezais pernambucanos**, 2014. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

MEMOLI, V.; ESPOSITO, F.; PANICO, S. C.; MARCO, A.; BARILE, R.; MAISTO, G. V. Evaluation of tourism impact on soil metal accumulation through single and integrated indices. **Science of The Total Environment**, v. 682, p. 685-691, 2019.

MCCLESKEY, R. B.; CLOR, L. E.; LOWENSTERN, J. B.; EVANS, W. C.; NORDSTROM, D. K.; HEASLER, H.; HUEBNER, M. A. Solute and geothermal flux monitoring using electrical conductivity in the Madison, Firehole, and Gibbon Rivers, Yellowstone National Park. **Applied geochemistry**, v. 27, p. 2370-2381, 2012.

METHNENI, N.; GONZÁLEZ, J. A. M.; VAN LOCO, J.; ANTHONISSEN, R.; VAN DE MAELE, J.; VERSCHAEVE, L.; FERNANDEZ-SERRANO, M.; MANSOUR, H. B. Ecotoxicity profile of heavily contaminated surface water of two rivers in Tunisia. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103550, 2021.

MIAO, X.; HAO, Y.; LIU, H.; XIE, Z.; MIAO, D.; HE, X. Effects of heavy metals speciations in sediments on their bioaccumulation in wild fish in rivers in Liuzhou—A typical karst catchment in southwest China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, p. 112099, 2021.

MISHRA, S.; BHARAGAVA, R. N.; MORE, N.; YADAV, A.; ZAINITH, S.; MANI, S.; CHOWDHARY, P. Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. In: **Environmental biotechnology: For sustainable future**. Springer, Singapore, p. 103-125, 2019.

MISHRA, S.; CHOWDHARY, P.; BHARAGAVA, R. N. Conventional methods for the removal of industrial pollutants, their merits and demerits. In: **Emerging and eco-friendly approaches for waste management**. Springer, Singapore, p. 1-31, 2019.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Água**. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/noticia-acom-2017-01-2100>>. Acesso em: 13 mai. 2021.

MOORE, Janet. **Uma introdução aos invertebrados**. São Paulo, Editora: Santos, 2003, 356 p.

MORAIS, C. R.; CARVALHO, S. M.; ARAUJO, G. R.; SOUTO, H. N.; BONETTI, A. M.; MORELLI, S.; CAMPOS JÚNIOR, E. O. Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in *Geophagus brasiliensis*. **Chemosphere**, v. 152, p. 328-334, 2016.

MORAIS, Vinícius Henrique Teixeira. **Uso de *Biomphalaria glabrata* na monitoração passiva de águas de poços artesianos com influência de Materiais Radioativos de Ocorrência Natural (NORM)**, 2020. 86 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

NAKANO, E.; WATANABE, L. C.; OHLWEILER, F. P.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, p. 145-154, 2003.

NAPIERSKA, D.; SANSEVERINO, I.; LOOS, R.; CORTÉS, L. G.; NIEGOWSKA, M.; LETTIERI, T. H. Modes of action of the current Priority Substances list under the Water Framework Directive and other substances of interest. In: **EUR 29008 EN, JRC110117, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Luxembourg**. 2018, 212 p.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LENARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 13^a. ed. Editora: Athene. 2016. 616 p.

NICA, D.; POPESCU, C.; DRAGHICI, G.; PRIVISTIRESCU, I.; SUCIU, M.; STÖGER, R. Effect of cadmium on cytosine hydroxymethylation in gastropod hepatopancreas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 15187-15195, 2017.

OBIAKOR, M. O.; OKONKWO, J. C.; NNABUDE, P. C.; EZEONYEJIAKU, C. D. Eco-genotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: a review. **Journal of Animal Science Advances**, v. 2, p. 123-133, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; NAKANO, E.; TALLARICO, L. F. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria sp.*: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 61, p. 49-57, 2017.

OLIVEIRA, Maria Luiza Marinho. **Análise ecotoxicológica e mutagênica da região têxtil de Toritama utilizando *Aliivibrio fischeri*, *Biomphalaria glabrata* e *Daphnia magna***, 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2017.

OLIVEIRA, Raimundo Márcio Pereira de. **Efeito genotóxico das águas superficiais do baixo curso da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe, Pernambuco-Brasil**, 2019. 57 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2019.

PATHAK, A. K.; KOTHARI, R.; TYAGI, V. V.; ANAND, S. Integrated approach for textile industry wastewater for efficient hydrogen production and treatment through solar PV electrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 25768-25782, 2020

PELLEGGRI, V.; GORBI, G.; BUSCHINI, A. DNA damage detection by Comet Assay on *Daphnia magna*: application in freshwater biomonitoring. **Science of The Total Environment**, v. 705, p. 135780, 2020.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan S.A., 2011.

PESQUEIRA, J. F. J. R.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. Environmental impact assessment of advanced urban wastewater treatment technologies for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 261, p. 121078, 2020.

PETER, D. H.; SARDY, S.; RODRIGUEZ, J. D.; CASTELLA, E.; SLAVEYKOVA, V. I. Modeling whole body trace metal concentrations in aquatic invertebrate communities: A trait-based approach. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 419-428, 2018.

PILA, E. A.; PECK, S. J.; HANINGTON, P. C. The protein pheromone temptin is an attractant of the gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 203, p. 855-866, 2017.

PILA, E. A.; SULLIVAN, J. T.; WU, X. Z.; FANG, J.; RUDKO, S. P.; GORDY, M. A.; HANINGTON, P. C. Haematopoiesis in molluscs: a review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, p. 119-128, 2016.

PINILLA-CORTÉS, P. C.; MORENO-GUTIÉRREZ, J. A. Attributes of Biothic Indicators as an Instrument for Assessing Ecosystem Integrity. **Open Access Library Journal**, v. 6, p. 1, 2019.

PIRATOBA, A. R. A.; RIBEIRO, H. M. C.; MORALES, G. P.; GONÇALVES, W. Caracterização de parâmetros de qualidade da água na área portuária de Barcarena, PA, Brasil. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12, p. 435- 456, 2017.

POLECHOŃSKA, L.; KLINK, A.; DAMBIEC, M.; RUDECKI, A. Evaluation of *Ceratophyllum demersum* as the accumulative bioindicator for trace metals. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 274–281, 2018.

RAINBOW, Philips S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

REY, Luís. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª ed. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2008. 883 p.

REY, Luís. **Bases da parasitologia médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2015. 404 p.

ROCHA, T. L.; GOMES, T.; PINHEIRO, J. P.; SOUSA, V. S.; NUNES, L. M.; TEIXEIRA, M. R.; BEBIANNO, M. J. Toxicokinetics and tissue distribution of cadmium-based Quantum Dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 207-214, 2015.

SALAMAT, Z.; SULLIVAN, J. T. Involvement of protein kinase C signalling and mitogenactivated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, p. 725-727, 2009.

SANTOS, Katarine Mizan Barbosa. **Pressão ambiental sobre *Littoraria angulifera*: acumulação de elementos químicos e mutagenicidade associadas a alterações histológica**, 2016. 101 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SANYAL, T.; KAVIRAJ, A.; SAHA, S. Deposition of chromium in aquatic ecosystem from effluents of handloom textile industries in Ranaghat–Fulia region of West Bengal, India. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 995-1002, 2015.

SCALIZE, P. S.; GABRIEL, E. F. M.; LIMA, F. S.; ARRUDA, P. N.; LOPES, H. T. L.; REIS, Y. P.; CARNEIRO, L. C.; BEZERRA, N. R.; FIACCADORI, F. S.; BAUMANN, L. R. F. Physicochemical, microbiological quality, and risk assessment of water consumed by a quilombola community in midwestern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-17, 2021.

SCHULTZ, D. C. A.; BENINCÁ, C. Identificação de aspectos e impactos ambientais da indústria petroquímica. **5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente**. Bento Gonçalves – RS, Brasil. 2016, 7 p.

SEIXAS, R. Prelúdio. 1974. Disponível em: <https://www.vagalume.com.br/raul-seixas/preludio.html>. Acesso em: 21fev. 2022.

SES – SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO. **Guia de apoio operacional ao Sistema de Informação do Programa de Controle da**

Esquistossomose para os municípios do estado de Pernambuco. 2012. Disponível em: http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/esquistossomose_-_guia_sispce_.pdf. Acesso em: 21 set. 2021.

SHUKLA, R. K.; KUMAR, A.; GURBANI, D.; PANDEY, A. K.; SINGH, S.; DHAWAN, A. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. **Nanotoxicology**, v. 7, p. 48-60, 2013.

SIDDIQUI, E.; PANDEY, J. Assessment of heavy metal pollution in water and surface sediment and evaluation of ecological risks associated with sediment contamination in the Ganga River: a basin-scale study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 10926-10940, 2019.

SILVA, F. A. D.; SCHNEIDER, C. H.; FELDBERG, E.; BACCARO, F. B.; CARVALHO, N. D. M.; GROSS, M. C. Genomic organization under different environmental conditions: *Hoplosternum littorale* as a model. **Zebrafish**, v. 13, p. 197-208, 2016.

SILVA, H. A. M. F.; SÁ, J. L. F.; SIQUEIRA, W. N.; LIMA, M. V.; MARTINS, M. C. B.; AIRES, A.L.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; FALCÃO, E. P.S.; BURIL, M. L. L.; PEREIRA, E. C.; MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta tropica**, v. 196, p. 172-179, 2019.

SILVA, Jordany Gomes da. **Avaliação genotóxica e mutagênica em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) das águas do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil**, 2019. 131 p. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, L. R. S.; AUGUSTO, R. L.; SIQUEIRA, W. N.; PEREIRA, D. R.; SILVA, E. B.; MELO, A. M. M. A. Oxidative stress in mollusks *Biomphalaria glabrata* exposed to gamma radiation. **Scientia Plena**, v. 14, n. 7, 2018.

SILVA, L. R. S.; SILVA, E. B.; AMARAL, A. J.; AMANCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Avaliação da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama. **Scientia Plena**, v. 9, p. 1-6, 2013.

SILVA, R. C.; MOTTA, M. A.; AMÂNCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Efeitos do oxifluorfem na fecundidade e no teor de proteínas do caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, p. 73-82, 2008.

SILVA, Y. J. A. B.; CANTALICE, J. R. B.; SINGH, V. P.; DO NASCIMENTO, C. W. A.; PISCOYA, V. C.; GUERRA, S. M. Trace element fluxes in sediments of an environmentally impacted river from a coastal zone of Brazil. **Environmental science and pollution research**, v. 22, n. 19, p. 14755-14766, 2015.

SIMÕES, Natanael Augusto Viana. **Classificação do clima local de sítios urbanos de Feira de Santana**. 2017. 114 p. Dissertação (Mestrado em Computação Aplicada), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santa, 2017.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA, W. N.; FRANÇA, E. J.; PEREIRA, D. R.; LIMA, M. V., SILVA, H. A. M. F., ARAÚJO, H. D. A.; SÁ, J. L. F.; MELO, A. M. M.A. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**, v. 249, p. 126218, 2020.

SIQUEIRA, W. N.; FRANÇA, E. J.; PEREIRA, D. R.; LIMA, M. V.; SILVA, H. A. M. F.; SÁ, J. L. F.; ARAÚJO, H. D. A.; MELO, A. M. M. A. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2021.

SONNACK, L.; KLAWONN, T.; KRIEHLER, R.; HOLLERT, H.; SCHÄFERS, C.; FENSKE, M. Comparative analysis of the transcriptome responses of zebrafish embryos after exposure to low concentrations of cadmium, cobalt and

copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 25, p. 99-108, 2018.

SOUZA, D. F.; PINTO, A. L.; MENDES, A. M. S.; OLIVEIRA, G. H. Classificação CONAMA das limitações de uso da água superficial da lagoa Maior, Três Lagoas/MS. **Revista Geonorte**, v. 3, p. 771-780, 2012.

STEPHANSEN, D. A.; NIELSEN, A. H.; HVITVED-JACOBSEN, T.; PEDERSEN, M. L.; VOLLERTSEN, J. Invertebrates in stormwater wet detention ponds—Sediment accumulation and bioaccumulation of heavy metals have no effect on biodiversity and community structure. **Science of the Total Environment**, v. 566-567, p. 1579-1587, 2016.

TALLARICO, L. F.; BORRELY, S. I.; HAMADA, N.; GRAZEFFE, V. S.; OHLWEILER, F. P.; OKAZAKI, K.; GRANATELLI, A. T.; PEREIRA, I. W.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 208-215, 2014.

TALLARICO, L. F.; MIYASATO, P. A.; NAKANO, E. Rearing and Maintenance of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): Adults and Embryos under Laboratory Conditions. **Annals of Aquaculture and Research**, v. 3, p. 1013, 2016.

TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G.; PATLOLLA, A. K.; SUTTON, D. J. Heavy metals toxicity and the environment. In: **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, p. 133–164, 2012.

THOLKAPPIAN, M.; RAVISANKAR, R.; CHANDRASEKARAN, A.; JEBAKUMAR, J. P. P.; KANAGASABAPATHY, K. V.; PRASAD, M. V. R.; SATAPATHY, K. K. Assessing heavy metal toxicity in sediments of Chennai Coast of Tamil Nadu using Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectroscopy (EDXRF) with statistical approach. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 173-182, 2018.

THORSLUND J.; JARSJO J.; CHALOV S. R.; BELOZEROVA E. V. Gold mining impact on riverine heavy metal transport in a sparsely monitored region: the upper

Lake Baikal Basin case. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, p. 2780–2792, 2012.

TOMLINSON, D. L.; WILSON, J. G.; HARRIS, C. R.; JEFFREY, D. W. Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. **Helgoländer meeresuntersuchungen**, v. 33, p. 566-575, 1980.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency. Summary of biological assessment programs and biocriteria development for states, tribes, territories, and interstate commissions: streams and wadeable rivers. **U. S. Environmental Protection Agency**, Washington, D.C. 2002.

VACCHI, F. I.; VENDEMIATTI, J. A. S.; BROSELIN, V.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B.; DEMEO, M., BONY, S.; DEVAUX, A.; UMBUZEIRO, G. A. Combining different assays and chemical analysis to characterize the genotoxicity of waters impacted by textile discharges. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 57, p. 559-571, 2016.

VAN DEN BRINK, N. W.; KOKALJ, A. J.; SILVA, P. V.; LAHIVE, E.; NORRFORS, K.; BACCARO, M.; KHODAPARAST, Z.; LOUREIRO, S.; DROBNE, D.; CORNELIS, G.; LOFTS, S.; HANDY, R. D.; SVENDSEN, C.; SPURGEON, D.; VAN GESTEL, C. A. M. Tools and rules for modelling uptake and bioaccumulation of nanomaterials in invertebrate organisms. **Environmental Science: Nano**, v. 6, p. 1985-2001, 2019.

VELUSAMY, S.; ROY, A.; SUNDARAM, S.; KUMAR, M. T. A Review on Heavy Metal Ions and Containing Dyes Removal Through Graphene Oxide-Based Adsorption Strategies for Textile Wastewater Treatment. **The Chemical Record**, v. 21, p. 1570-1610, 2021.

VIERS, J.; DUPRÉ, B.; GAILLARDET, J. Chemical composition of suspended sediments in World Rivers: New insights from a new database. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 853-868, 2009.

VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A. P.; SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples

(Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 628, p. 76-86, 2007.

WACZUK, E. P.; KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; MEINERZ, D. F.; BUENO, D. C.; GONZAGA, T. K. S. N.; DOROW, T. S. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; ÁVILA, D. S. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology Research**, v. 4, p. 739-748, 2015.

WANG, M.; HAN, Q.; GUI, C.; CAO, J.; LIU, Y.; HE, X.; HE, Y. Differences in the risk assessment of soil heavy metals between newly built and original parks in Jiaozuo, Henan Province, China. **Science of The Total Environment**, v. 676, p. 1-10, 2019.

YAO, J.; YANG, Z.; LI, H.; QU, Y.; QIU, B. Effects of waterborne exposure to cadmium on biochemical responses in the freshwater gastropod, *Bellamya aeruginosa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 193, p. 110365, 2020.

ZHANG, W.; LIU, W.; ZHANG, J.; ZHAO, H.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; JIN, Y. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **Journal of environmental sciences**, v. 24, p. 2019-2027, 2012.

ZHOU, H.; XIANG, N.; XIE, J.; DIAO, X. Ecotoxicology: The History and Present Direction. **Encyclopedia of Ecology (Second Edition)**, v. 1, p. 415-423, 2019.

ZHUANG, W.; YING, S. C.; FRIE, A. L.; WANG, Q.; SONG, J.; LIU, Y.; CHEN, Q.; LAI, X. Distribution, pollution status, and source apportionment of trace metals in lake sediments under the influence of the South-to-North Water Transfer Project, China. **Science of The Total Environment**, v. 671, p. 108-118, 2019.

APÊNDICE A - VALORES DE REFERÊNCIAS

Valores obtidos e certificados (mg kg^{-1}) e suas respectivas incertezas em nível de confiança dos elementos determinados nos materiais de referência 2710 Montana Soil (sedimentos) e TM-01 Tecido de mexilhão (moluscos) analisados por GFAAS e FAAS.

Analito	SRM 2710 – Montana Soil				E_n
	Certificado		Obtido		
	Valor	Inc	Valor	Inc	
Fe	27000	± 5000	27000	± 3790	-0,0
Zn	5900	± 850	5900	± 975	-0,0
Cu	2700	± 500	2677	± 491	-0,0
Ni	10,1	$\pm 3,1$	15	± 4	0,9
Cd	20	$\pm 6,5$	20	± 6	-0,0
V	43	$\pm 6,5$	42	± 9	-0,1
Cr	19	± 4	19	± 4	-0,0

- Sedimento em suspensão:

Analito	Estação seca								Estação chuvosa							
	P1		P2		P3		P4		P1		P2		P3		P4	
	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc
Fe	59200	± 8320	18700	± 2630	2840	± 400	13400	± 1880	70500	± 9910	53600	± 7527	3500	± 492	41800	± 5882
Zn	163	± 27	61	± 10	174	± 29	176	± 29	107	± 18	404	± 67	241	± 40	535	± 88
Cu	33	± 3	15,6	$\pm 1,6$	59,8	± 14	92,3	± 21	26,7	± 3	34,6	± 8	95,6	± 22	131,5	± 30
Ni	6,3	$\pm 1,7$	23	± 6	9,18	$\pm 2,5$	13	± 3	28	± 8	57	± 16	15	± 4	24	± 7
Cd	0,10	$\pm 0,03$	0,10	$\pm 0,03$	0,38	$\pm 0,12$	0,37	$\pm 0,12$	0,19	$\pm 0,06$	0,26	$\pm 0,08$	0,24	$\pm 0,08$	0,70	$\pm 0,22$
V	46	± 10	80	± 18	26	± 6	37	± 8	85	± 19	98	± 22	30	± 7	100	± 22

Cr	44 ±10	69 ±15	11 ±2	28 ±6	57 ±13	133 ±30	13 ±3	95, ±21
-----------	--------	--------	-------	-------	--------	---------	-------	---------

- Sedimento de fundo de rio:

Analito	Estação seca								Estação chuvosa							
	P1		P2		P3		P4		P1		P2		P3		P4	
	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc
Fe	4200	±590	3800	±534	2228 8	±313 2	23000	±3260	5100	±721	18900	±2668	1177 6	±1655	51700	±727 0
Zn	8,4	±1,4	7,2	±1,2	156	±26	218	±36	13	±2	39	±6	54	±9	320	±53
Cu	4,8	±0,5	2,6	±0,3	222	±50	67	±15	5,2	±0,5	15	±2	26	±3	103	±23
Ni	1,6	±0,4	4,5	±1,2	47,2 8	±12, 8	18,6	±5,0	4,2	±1,1	20,4	±5,5	15	±4	41,5	±11, 2
Cd	0,016	±0,0 05	0,013	±0,00 4	0,37	±0,1 2	0,35	±0,11	0,012	±0,00 4	0,041	±0,01 3	0,05 5	±0,018	0,64	±0,2 0
V	7,5	±1,7	10	±2	53	±12	43	±10	11	±3	40	±9	28	±6	96	±21
Cr	5,4	±1,2	16	±4	114	±26	53	±12	14	±3	42	±9	49	±11	93	±21

Valor (valor obtido durante a análise); Inc (incerteza); E_n (Número E_n).

- Bioacumulação em moluscos *Biomphalaria glabrata*:

Analito	TM-01 – Tecido de Mexilhão				E _n
	Certificado		Obtido		
	Valor	Inc	Valor	Inc	
Fe	593	± 53	593	± 18	0,00
Zn	118,5	± 9,5	118,5	± 4,53	0,00
Cu	11,3	± 1,7	10,48	± 2,29	-0,31
Ni	7	± 1,3	7	± 2,06	-0,02
Cd	0,58	± 0,10	0,58	± 0,08	-0,01
V	2,89	± 0,67	2,89	± 0,52	-0,01
Cr	1,24	± 0,28	1,24	± 0,14	0,00

Valor (valor obtido durante a análise); Inc (incerteza); E_n (Número E_n).

Analito	Estação seca						Estação chuvosa					
	P1		P2		P3		P1		P2		P3	
	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc	Valor	Inc
Fe	2102	± 64	2230	± 68	1700	± 52	3160	± 97	2608	± 80	2300	± 72
Zn	113	± 4	114	± 4	111	± 4	98	± 4	103	± 4	101	± 4
Cu	14	± 3	15	± 3	13	± 3	13	± 3	14	± 3	14	± 3
Ni	1,3	± 0,4	1,7	± 0,5	1,3	± 0,4	2,5	± 0,7	2,9	± 0,8	1,8	± 0,5
Cd	0,021	± 0,003	0,026	± 0,004	0,019	± 0,003	0,013	± 0,002	0,020	± 0,003	0,018	± 0,002
V	1,20	± 0,22	0,68	± 0,12	0,85	± 0,15	0,99	± 0,18	0,96	± 0,17	1,41	± 0,25
Cr	0,46	± 0,05	0,86	± 0,10	0,45	± 0,05	0,64	± 0,08	0,35	± 0,04	5,94	± 0,69