



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

VAGNER JOSE DE ALBUQUERQUE

**EFEITOS DE ELEMENTOS METÁLICOS NA SAÚDE DE *PHYSALAEMUS
CUIVERI* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E NA QUALIDADE DA ÁGUA
PRÓXIMO A RODOVIA**

ERECHIM

2023

VAGNER JOSE DE ALBUQUERQUE

**EFEITOS DE ELEMENTOS METÁLICOS NA SAÚDE DE *PHYSALAEMUS
CUVIERI* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E NA QUALIDADE DA ÁGUA
PRÓXIMO AS RODOVIAS**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental

Orientador(a): Dr. Paulo Afonso Hartmann
Coorientador(a): Dra. Marília Hartmann

ERECHIM
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

ERS 135- KM 72, n° 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal 764

Erechim-RS Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Albuquerque, Vagner Jose de
EFEITOS DE ELEMENTOS METÁLICOS NA SAÚDE DE
PHYSALAEMUS CUVIERI (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E NA
QUALIDADE DA ÁGUA PRÓXIMO A RODOVIA / Vagner Jose de
Albuquerque. -- 2023.
69 f.:il.

Orientador: Doutor Paulo Afonso Hartmann
Co-orientadora: Doutor Marília Teresinha Hartmann
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim,RS, 2023.

1. Ciências Ambientais. I. Hartmann, Paulo Afonso,
orient. II. Hartmann, Marília Teresinha, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

VAGNER JOSE DE ALBUQUERQUE

**EFEITOS DE ELEMENTOS METÁLICOS NA SAÚDE DE *PHYSALAEMUS*
CUVIERI (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E NA QUALIDADE DA ÁGUA
PRÓXIMO A RODOVIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia Ambiental.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 27/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann
Orientador

Prof. Dr.^a Marília Hartmann
Coorientador

Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto
Membro Externo – UFFS

Dra. Caroline Müller
Membro Externo – Bolsista Pós-
Doc PPGCTA

ERECHIM
2023

EFEITOS DE ELEMENTOS METÁLICOS NA SAÚDE DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E NA QUALIDADE DA ÁGUA PRÓXIMO A RODOVIA

RESUMO

As rodovias são fontes geradoras de poluentes que podem afetar os ambientes aquáticos e, por consequência, a saúde de organismos que dependem da água para sobreviver e reproduzir. Dentre as substâncias com potencial poluidor, encontram-se os elementos metálicos. Ao exceder a capacidade de carga do ambiente, os elementos metálicos tornam-se fonte de poluição ambiental, apresentando-se como substâncias com propriedades prejudiciais e bioacumulativas. Este estudo teve por objetivo analisar o efeito de elementos metálicos na saúde de uma espécie de anfíbio nativo da região sul do Brasil (*Physalaemus cuvieri*) e na qualidade da água de mananciais hídricos próximos a rodovia. Para as análises ecotoxicológicas foram realizados bioensaios de toxicidade crônica expondo girinos de *Physalaemus cuvieri* (rã-chorona) ao sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) e sulfato de zinco ($ZnSO_4$) por 14 dias. Os ensaios foram conduzidos em recipientes de vidro, utilizando diferentes concentrações de alumínio ($0,10\text{ mg L}^{-1}$, $0,20\text{ mg L}^{-1}$ e $0,30\text{ mg L}^{-1}$) e de Zinco ($0,18\text{ mg L}^{-1}$, $0,27\text{ mg L}^{-1}$ e $0,35\text{ mg L}^{-1}$), em triplicata. O sulfato de alumínio e o sulfato de zinco não causaram letalidade nos indivíduos de *P. cuvieri*. No entanto, esses metais interferiram no desenvolvimento dos girinos, sobretudo induzindo a diferença de massa, comprimento e aumentando a razão neutrófilo/linfócito, importante indicativo de estresse animal. Para análise da concentração de elementos metálicos na água do entorno de rodovias foram realizadas amostragens em mananciais hídricos com e sem influência da rodovia ERS-135, entre os municípios de Sertão e Erechim no norte do Estado do Rio Grande do Sul. Em cada ponto foram coletadas duas amostras de água. A estimativa da presença e da concentração de elementos metálicos foi realizada por meio de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Foi avaliada a presença e a concentração dos elementos Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn. Os resultados encontrados indicam que a proximidade da rodovia teve influência na concentração de metais da água em seu entorno. Os pontos no entorno da rodovia apresentarem as maiores concentrações para sete dos oito

elementos e para três elementos houve diferença entre as concentrações no entorno da rodovia e as áreas agrícolas ou no Parque (Ca, Mg, Na).

Palavras-chave: Amphibia; toxicidade crônica; estresse, rodovias, contaminação

EFFECTS OF METALLIC ELEMENTS ON THE HEALTH OF *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) AND WATER QUALITY NEAR ROADS

ABSTRACT

Roads are sources of pollutants that can affect aquatic environments and, consequently, the health of organisms that depend on water to survive and reproduce. Among the substances with polluting potential are metallic elements. By exceeding the carrying capacity of the environment, metallic elements become a source of environmental pollution, presenting themselves as substances with harmful and bioaccumulative properties. This study aimed to evaluate the effect of Al and Zn on the health of amphibians native to the southern region of Brazil and analyze the effect of the presence of roads on the occurrence of metallic elements in water. For ecotoxicological analysis, bioassays were carried out for 14 consecutive days exposing *Physalaemus cuvieri* (crying frog) tadpoles to aluminum sulfate and zinc sulfate. The tests were carried out in glass containers, using different concentrations of aluminum (0.10 mg L⁻¹, 0.20 mg L⁻¹ and 0.30 mg L⁻¹) and zinc (0.18 mg L⁻¹, 0.27 mg L⁻¹), in triplicate. The results of the bioassay data demonstrated that Al and Zn did not cause lethality, but interfered in the development of tadpoles, especially by inducing differences in mass and length and increasing the neutrophil/lymphocyte ratio, an important indicator of animal stress. The study on the presence of metals on roads was carried out on the banks of the RS-135 road, between the municipalities of Sertão and Erechim in the north of the State of Rio Grande do Sul. Water samples were taken from nearby water sources with or without the influence of the road. At each point, two water samples were collected. The estimation of the presence and concentration of metallic elements was carried out using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). The presence and concentration of the elements Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, Zn were evaluated. The results shown that proximity with roads had an influence on the concentration of metals in the waters around. The waters near roads had greater concentration of metal elements when compared to other areas, mainly Ca, Mg and Na.

Keywords: Amphibia; chronic toxicity; stress, roads, contamination.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Paulo Hartmann e Marília Hartmann, pela oportunidade, atenção, conhecimentos transmitidos e por sempre estarem presentes para esclarecerem as minhas dúvidas e questionamentos. Agradeço todo o apoio, amizade e firme orientação nesses dois anos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental, pela transmissão do conhecimento e na busca da construção da ciência.

A Universidade Federal da Fronteira Sul, que proporcionou o melhor dos ambientes para que esse trabalho fosse realizado. A Tânia, secretária acadêmica, sempre prestativa e atenciosa.

Ao Laboratório de Ecologia e Conservação e ao Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Conservação da Fauna, por seu otimismo e valor. Em especial a Alexandre Folador e Inete Baú.

Agradeço ao servidor-técnico Rafael Santos, pela ajuda na análise da água, pela parceria e amizade.

Ao Hospital de Clínicas de Passo Fundo pela compreensão e investimento nesse momento de formação.

Os colegas Clarissa, Luiz e Nívio pelas conversas e estímulo.

Meu muito obrigada a todos e a cada um, com certeza não tenho como agradecer o suficiente, mas saibam que são parte importante de minha vitória.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Comprimento corporal (mm) dos girinos de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações (mg L⁻¹) de Alumínio (Al) e Zinco (Zn). Barras representam médias ± DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: Zinco: ** (P=0,0010), *** (P=0,0005).....26
- Figura 2.** Massa corporal (g) dos girinos de *Physalemus cuvieri* expostos a Alumínio (Al) e Zinco (Zn). Barras representam médias ± DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: Alumínio *** (P=0,0002) e zinco * (P=0,0479), ** (P=0,0010), *** (P=0,0003).....27
- Figura 3.** Contagem diferencial relativa (%) de leucócitos de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio. Barras representam médias ± DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: **A)** **** (P<0,0001), **B)** ** (P=0,0021), **** (P<0,0001), **C) ns**, **D)** * (P=0,0208), **E)** * (P=0,0113), ** (P=0,0020).....29
- Figura 4.** Contagem diferencial relativa (%) de leucócitos de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de zinco. Barras representam médias ± DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: **A)** * (P=0,0285), ** (P=0,0175), *** (P=0,0084), **** (P<0,0001), **B)** * (P=0,0191), ** (P=0,0015), **** (P<0,0001), **C) ns**, **D) ns**, **E)** ** (P=0,0068) **** (P<0,0001).....30
- Figura 5.** Razão Neutrófilo/Linfócito na amostra de sangue de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio. Barras representam médias ± DP. Diferenças estatísticas: alumínio * (P=0,0113), **** (P<0,0001) e zinco ** (P=0,00053) **** (P<0,0001).....31

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Mapa de localização pontos de amostragem de água. Sist. Referência: SIRGAS 2000. Sistema de coordenadas geográficas. Laboratório de Geoprocessamento. Junho/2023. Pontos amostrais: Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 – PNMS3).....52
- Figura 2.** Matriz de correlação lineares de dados obtidos das concentrações de elementos metálicos contidos nas amostras de água.....58
- Figura 3.** Dendrograma das concentrações de metais registrados nos pontos de amostrais. Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 – PNMS3).....59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Concentração de Alumínio (Al) e zinco Zinco (Zn) utilizadas nos ensaios de toxicidade com girinos *Physalaemus cuvieri*.....23
- Tabela 2.** Malformações (%) observadas em girinos de *Physalaemus cuvieri*, após 14 dias de exposição crônica a diferentes concentrações de Alumínio (Al) e Zinco (Zn).....27
- Tabela 3.** Resumo do perfil leucocitário relativo (%) das diferentes espécies de anuros bioindicadores, Família Leptodactylidae. LI, linfócitos; NE, neutrófilos; MO, monócitos; OE, eosinófilos; BA, basófilos; N/L Razão neutrofilo-Linfócito.....32
- Tabela S1.** Sobrevivência (%) em horas de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio (Al; 0,10 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹, 0,30 mg L⁻¹) e zinco (Zn; 0,18 mg L⁻¹, 0,27 mg L⁻¹, 0,35 mg L⁻¹) em teste crônico por 14 dias.....45
- Tabela S2.** Perfil leucocitário por contagem diferencial relativa (%) de leucócitos (LE), neutrófilos (NE), monócitos (MO), eosinófilos (EO) e basófilos (BA) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Alumínio (Al 0,10 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹, 0,30 mg L⁻¹ e Zinco (Zn; 0,18 mg L⁻¹, 0,27 mg L⁻¹, 0,35 mg L⁻¹) em teste crônico por 14 dias. Os dados representam valores médios ± SEM.....45

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Comprimento de onda por metal testado por espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido ICP-OES.....53

Tabela 2. Concentração de elementos metálicos na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de acordo com o local de coleta. $<\text{LOD} = <5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Alumínio (Al), Cálcio (Ca) Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn). Pontos amostrais: Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 - PNMS3). C1 – Coleta 1 (outubro 2022), C2 – Coleta 2 (dezembro 2022). Em negrito as maiores concentrações registradas por elemento, por coleta de água.....56

Tabela 3. Diferenças estatísticas entre os pontos amostrados. Metais Alumínio (Al), Cálcio (Ca) Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn). Pontos amostrais: Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 – PNMS3).....57

Tabela 4. Comparação entre valores máximos para cada elemento metálico detectado nas análises de água (mg/l) com a padronização da norma Brasileira para água do Tipo II (mg/L^{-1}). NP – metal não padronizado. Em negrito as maiores concentrações registradas por elemento.....58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al - Alumínio

As - Arsênio

Ca - Cálcio

Cd - Cadmio

Co - Cobalto

CONCEA - Conselho Brasileiro de Controle de Experimentos

Cr - Cromo

Cu - Cobre

Fe - Ferro

FEPAM - Fundação Estadual de Proteção ao Meio Ambiente

g - Grama

ICP-OES - Sistema de espectrometria de Emissão Óptica em Plano Induzido

IFN- γ - Interferon gama

K - Potássio

Mg - Magnésio

Mn - Manganês

mg - Miligramas

Na - Sódio

PAB - Projeto Básico de Gestão Ambiental

Pb - Chumbo

PGRSEL - Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos e Efluentes

PNMS - Parque Natural Municipal de Sertão

RODO - Rodovia

Se - Selênio

µg – Microgramas

UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. CAPÍTULO I. SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE <i>PHYSALEMUS CUVIERI</i> (FITZINGER, 1826) A EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ALUMÍNIO E ZINCO	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.2.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICAS.....	23
3.2.2 ORGANISMOS TESTES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	24
3.2.3 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E MALFORMAÇÃO.....	25
3.2.4 PERFIL LEUCOCITÁRIO	25
3.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3.3 RESULTADOS.....	26
3.4 DISCUSSÃO.....	32
3.5 CONCLUSÕES.....	36
3.6 REFERÊNCIAS.....	37
3.7 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	45
4 CAPÍTULO II RODOVIAS AUMENTAM A CONCENTRAÇÃO METAIS NAS ÁGUAS EM SEU ENTORNO? UM ESTUDO DE CASO NO SUL DO BRASIL.....	46
4.1 INTRODUÇÃO.....	48
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	50
3.2.2 COLETA E ANÁLISE DE ÁGUA	51
4.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.3 RESULTADOS.....	54
4.4 DISCUSSÃO.....	59
4.5 CONCLUSÃO.....	63
6 REFERÊNCIAS.....	64

APRESENTAÇÃO

O presente estudo intitulado EFEITOS DE ELEMENTOS METÁLICOS NA SAÚDE DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E NA QUALIDADE DA ÁGUA PRÓXIMO A RODOVIA foi desenvolvido no âmbito do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), nível de mestrado, da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim. O PPGCTA faz parte da área 49 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ciências Ambientais (CiAmb), que tem por objetivo produzir e discutir conhecimentos de forma interdisciplinar. No PPGCTA o projeto está associado a área de concentração “Produção Sustentável e Conservação Ambiental” e a linha de pesquisa “Conservação do Recursos Naturais”. Esta dissertação está vinculada ao Laboratório de Ecologia e Conservação e ao Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Conservação da Fauna – GPCON, e faz parte do projeto guarda-chuva “Efeitos da fragmentação da paisagem na distribuição da diversidade de fauna no sul do Brasil”. Este projeto tem por objetivo identificar os impactos que a fragmentação da paisagem exerce sobre a fauna e propor soluções que visem a manutenção ou recuperação da biodiversidade local e regional. Os projetos desenvolvidos devem proporcionar o acúmulo de dados para avaliação e análise das relações resultantes da interface entre ambiente e desenvolvimento. Os estudos englobam teses, dissertações, trabalhos de conclusão de curso e de iniciação científica.

Esta dissertação está estruturada em forma de dois artigos: Capítulo 1 - Sensibilidade de girinos de *Physalemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) a exposição crônica a alumínio e zinco; e Capítulo 2 - Rodovias aumentam a concentração de metais nas águas em seu entorno? Um estudo de caso no sul do Brasil. No Capítulo 1 partimos da premissa que os elementos metálicos, mesmo em pequenas doses, podem ser nocivos a vida aquática. Neste sentido, examinamos as consequências da exposição crônica de *Physalemus cuvieri* a diferentes concentrações de alumínio e zinco. No capítulo 2, partimos da premissa que rodovias podem atuar com agentes que potencializam a concentração de elementos metálicos nas águas no seu entorno. Desta forma, analisamos a concentração de elementos metálicos em águas com e sem influência da rodovia.

OBJETIVOS

CAPÍTULO I

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a sensibilidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* a exposição crônica a alumínio e zinco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar sobrevivência, tamanho do corpo e malformações em girinos de *Physalaemus cuvieri* submetidas a diferentes concentrações de alumínio e zinco;
- Avaliar o efeito das concentrações de alumínio e zinco sobre o sistema imunológico de *Physalaemus cuvieri*, através da contagem diferencial relativa (%) de leucócitos e da razão N/L.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS GERAL

- Analisar a ocorrência de elementos metálicos em corpos hídricos com e sem a influência da rodovia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os principais elementos metálicos ocorrentes na água dos corpos hídricos com e sem a influência da rodovia;
- Estimar as concentrações de elementos metálicos ocorrente nos corpos hídricos amostrados;
- Comparar as concentrações de elementos metálicos em corpos hídricos com e sem a influência da rodovia.

CAPÍTULO I

SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE *PHYSALEMUS CUVIERI* (FITZINGER, 1826) A EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ALUMÍNIO E ZINCO

Vagner José de Albuquerque¹, Marília Hartmann¹, Paulo Afonso Hartmann¹

¹Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, ERS 135 - Km 72, 200, Cx Postal 764, CEP 99700-970, Erechim, RS, Brasil.

Resumo: A avaliação das respostas dos anfíbios como bioindicadores de exposição química é uma importante ferramenta para a conservação das espécies nativas e de seus habitats naturais. Neste estudo, avaliamos a sensibilidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* à exposição crônica a alumínio e zinco e levantamos a seguinte questão: como diferentes concentrações de alumínio (Al) e zinco (Zn) afetam a sobrevivência, o desenvolvimento e a resposta imune de *P. cuvieri*? Para responder a essa questão, foram realizadas análises ecotoxicológicas por meio de bioensaios de toxicidade crônica, nos quais girinos de *P. cuvieri* (rã-chorona) foram expostos a sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) e sulfato de zinco ($ZnSO_4$). Indivíduos de *P. cuvieri* foram mantidos em recipientes de vidro contendo diferentes concentrações de alumínio ($0,10\text{ mg L}^{-1}$, $0,20\text{ mg L}^{-1}$ e $0,30\text{ mg L}^{-1}$) e zinco ($0,18\text{ mg L}^{-1}$, $0,27\text{ mg L}^{-1}$, e $0,35\text{ mg L}^{-1}$) por 14 dias, e os testes foram realizados em triplicata. Ao final do período experimental, os organismos foram pesados, medidos e eutanasiados em solução de lidocaína. Foram avaliadas a sobrevivência e malformações bucais e intestinais. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para confecção de preparos hematológicos que foram corados com corante panóptico rápido para verificar o perfil leucocitário (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos) e a relação entre neutrófilos e linfócitos. As diferentes concentrações de Al e Zn não causaram letalidade em *P. cuvieri*. Porém, esses metais afetaram o desenvolvimento dos girinos e promoveram malformações de boca e intestino e ocorrência de hemorragias, principalmente nas maiores doses estudadas. Não foram observadas alterações na cauda e na coluna dos animais. Os linfócitos foram as células predominantes entre os leucócitos, sendo observadas linfopenia e neutrofilia nos tratamentos

18 Nota: esse artigo foi submetido a Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues, e segue o padrão editorial da revista.

com Al e Zn, resultando em aumento da relação neutrófilos/linfócitos, importante indicador de estresse nos animais

Palavras Chave: anuros, leucograma de estresse, bioindicadores, toxicologia ambiental.

SENSITIVITY OF *PHYSALEMUS CUVIERI* TADPOLES (FITZINGER, 1826) TO CHRONIC EXPOSURE TO ALUMINUM AND ZINC

Vagner José de Albuquerque¹, Marília Hartmann^{1*}, Paulo Afonso Hartmann¹

¹Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, ERS 135 - Km 72, 200, Cx Postal 764, CEP 99700-970, Erechim, RS, Brasil.

Abstract: The assessment of amphibian responses as bioindicators of chemical exposure is an important tool for the conservation of native species and their natural habitats. In this study, we evaluated the sensitivity of *Physalaemus cuvieri* tadpoles to chronic exposure to aluminum and zinc and raised the following question: How do different concentrations of aluminum and zinc affect the survival, development, and immune response of *P. cuvieri*? To answer this question, ecotoxicological analyzes were conducted by chronic toxicity bioassays in which tadpoles of *P. cuvieri* (weeping frog) were exposed to aluminum sulfate ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) and zinc sulfate (ZnSO_4). Individuals of *P. cuvieri* were kept in glass containers containing different concentrations of aluminum (0.10 mg L^{-1} , 0.20 mg L^{-1} , and 0.30 mg L^{-1}) and zinc (0.18 mg L^{-1} , 0.27 mg L^{-1} , and 0.35 mg L^{-1}) for 14 days, and the tests were performed in triplicate. At the end of the experimental period, the organisms were weighed, measured, and euthanized in a lidocaine solution. Survival and mouth and intestine malformations were assessed. Blood samples were collected by cardiac puncture to make hematological preparations that were stained with a panoptic rapid dye to verify the leukocyte profile (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, and monocytes) and the ratio between neutrophils and lymphocytes. The different concentrations of Al and Zn did not cause lethality in *P. cuvieri*. However, these metals affected tadpole development and promoted malformations of the mouth and intestine and the occurrence of hemorrhages, especially at the highest doses studied. No changes were observed in the tail and spine of the animals. Lymphocytes were the predominant cells among leukocytes, with lymphopenia and neutrophilia observed in treatments with Al and Zn, resulting in an increase in the neutrophil/lymphocyte ratio, an important indicator of stress in animals.

Key-words: anurans, stress leukogram, bioindicator, environmental toxicology.

INTRODUÇÃO

As perturbações antrópicas nos ambientes naturais influenciam na biologia dos organismos que procuram ajustar sua fisiologia para reduzir ou evitar o impacto dos agentes estressores (Burraco et al. 2017). Isso é particularmente importante quando considerarmos os diferentes tipos de alterações ambientais aos quais os organismos estão sujeitos, como o aumento de temperatura (Patra et al. 2015; Gómez et al. 2023), infecções por patógenos (Mason et al. 2013, Bilhalva et al. 2023), presença de agrotóxicos (Rutkoski et al. 2020, Pavan et al. 2021, Samojeden et al. 2022), além de outras substâncias químicas, como os elementos metálicos (Jayawardena et al, 2016; Chagas et al. 2020), foco do presente estudo.

Embora os metais desempenhem papel importante no metabolismo celular, podendo participar de processos enzimáticos, estruturais e regulatórios que atuam no crescimento dos organismos e de seu sistema imunológico (Maret, 2016), doses acima dos níveis adequados tendem a provocar desordem nas células e tecidos. Esse efeito ainda pode ser potencializado com a bioacumulação dos elementos metálicos nos tecidos e órgãos (Moschem e Gonçalvez, 2020). Entre os metais de interesse ecológico estão o alumínio (Al) e o zinco (Zn). O Al é considerado um metal pesado não essencial, com toxicidade para vertebrados aquáticos como anfíbios (Herkovits et al. 2015), e peixes (Slaninova et al. 2014, K AL Tae et al. 2020). Estudos com Al apontam que esse metal pode causar comprometimento da função excretora das brânquias e necrose do tecido branquial (Slaninova et al. 2014), hepatotoxicidade (Massoud et al. 2021) e neurotoxicidade (Closset et al. 2022) em peixes. O Zn tem sido descrito por causar estresse oxidativo e alterar o sistema endócrino, comprometendo a sobrevivência de peixes (Carvalho et al. 2020; Gárriz e Miranda, 2022; Taslima et al. 2022; Zhong et al. 2022), além de causar alterações metabólicas em anfíbios (Chagas et al. 2020).

A resposta ao estresse requer alterações metabólicas a fim de tentar manter a homeostase do organismo (Le Saux et al. 2020, Litimer et al. 2020). O tecido hematopoiético, responsável pela produção das células sanguíneas, é particularmente sensível às mudanças ambientais, e possui um padrão de neutrófilos e linfócitos conservado entre os vertebrados (Davis et al. 2008). Em condições de estresse, há um aumento da secreção de glicocorticoides

(Goessling et al. 2015), o que pode causar um aumento o aumento da razão neutrófilo – linfócito (N/L) na circulação periférica, pela ocorrência de linfopenia e da neutrofilia (Davis, Maney e Maerz, 2008, Santana et al. 2021). Esse fenômeno é observado nos grupos de vertebrados em resposta a estressores naturais. Assim, o perfil de leucócitos é descrito por ser um importante indicador da resposta fisiológica e de agentes químicos estressores, além de ser um marcador mais conservado em relação a outros marcadores (Goessling et al. 2015; Davis e Maney, 2018). No entanto, o leucograma de estresse ainda é pouco investigado em anfíbios.

As respostas fisiológicas aos contaminantes metálicos impõem um alto custo fisiológico que pode acarretar na alteração do tempo de crescimento e de maturidade sexual (Davis, 2009), perda de habilidade de desenvolver uma resposta imunológica a um estímulo (Priyadarshani et al. 2015). Além disso, a presença de elementos metálicos estressores no ambiente produz alterações morfológicas nos anfíbios (Vidya et al. 2018, Patar et al. 2021; Motta et al. 2023), que comprometem e influenciam na viabilidade das populações a longo prazo ao reduzirem a sua capacidade reprodutiva (Guo et al. 2018a, 2018b, Zhang et al., 2018).

Particularmente em anfíbios, os metais, no ambiente aquático, podem ser incorporados na fase larval pela exposição direta de seus ovos, pela elevada permeabilidade cutânea com rica vascularização e pelas brânquias (Smalling et al. 2021, Mani et al.2022). Devido ao seu ciclo larval e reprodutivo ocorrer em ambiente aquático, os anfíbios compõem um grupo considerado vulnerável a contaminação ambiental por metais, tornando-os importantes bioindicadores da qualidade do ambiente, por possibilitarem respostas mensuráveis proporcionais ao grau de perturbação (Sumanasekara et al.2015).

Dentre as espécies de anfíbios, destaca-se a *Physalaemus cuvieri* (STEFFEN 1815), uma espécie distribuída na América do Sul (Frost et al. 2023), amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa, e que demonstrou alta sensibilidade à outros contaminantes ambientais, como agrotóxicos (Wrubleswski et al. 2018, Herek et al. 2021; Rodrigues et al. 2020; Samojeden et al. 2022). *Physalaemus cuvieri* é uma espécie de hábitos noturnos e sua reprodução ocorre em poças, temporárias ou permanentes, geralmente em áreas abertas, onde

os ovos são depositados em ninhos de espuma flutuante presos à vegetação marginal das poças.

Dentro deste contexto, entender como potenciais contaminantes ambientais afetam a fisiologia dos anfíbios é essencial para o estabelecimento de estratégias de conservação das espécies nativas e de seus habitats naturais. Neste estudo avaliamos a sensibilidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* a exposição crônica ao alumínio (Al) e ao zinco (Zn) e procuramos responder a seguinte questão: como diferentes concentrações de Alumínio e Zinco afetam a sobrevivência, desenvolvimento e o sistema imunológico de *Physalaemus cuvieri*?

MATERIAIS E MÉTODOS

Substância química

Os metais utilizados na formulação química de sulfato foram o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e o sulfato de zinco (ZnSO_4). O sulfato de alumínio utilizado (Cris Água©, Atibaia, SP, Brasil) apresenta registro na Chemical Abstracts Service (no. 10043-01-3) e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, número 25351.632939/2014-92). O sulfato de zinco (CRQ©) apresenta registro na Chemical Abstracts Service (no. 7446-20-0) e não possui necessidade de registro na ANVISA.

Inicialmente foi preparada uma solução estoque (10 mg L^{-1}) para cada produto, a qual foi diluída em água deionizada para a obtenção das concentrações de 0,10, 0,20 e 0,30 mg L^{-1} de sulfato de alumínio e 0,18, 0,27 e 0,35 mg L^{-1} de sulfato de zinco. As concentrações de alumínio e de zinco foram baseadas nos valores permitidos para as águas Tipos I e III (BRASIL, 2005) e nos valores encontrados na literatura em experimentos com outros organismos (Carvalho et al. 2017) (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de Alumínio (AL) e Zinco (Zn) utilizadas nos ensaios de toxicidade com girinos *Physalaemus cuvieri*.

Tratamento	Concentração	Referências utilizadas para escolha das concentrações
ALUMÍNIO		
A11	0.10 mg L^{-1}	Valor permitido para água doce, classe 1, de acordo com resolução CONAMA 357 (Brasil, 2005)
A12	0.20 mg L^{-1}	Valor intermediário, entre o máximo permitido para classe 1 e 3 CONAMA 357 (Brasil, 2005).
A13	0.30 mg L^{-1}	Valor permitido para água doce, classe 3, de acordo com

resolução CONAMA 357 (Brasil, 2005)		
ZINCO		
Z1	0.18 mg L ⁻¹	Valor permitido para água doce, classe 1, de acordo com resolução CONAMA 357 (Brasil, 2005)
Z2	0.27 mg L ⁻¹	Efeitos em <i>Ceriodaphnia dubia</i> (Carvalho et al. 2017)
Z3	0.35 mg L ⁻¹	Efeitos em <i>Ceriodaphnia dubia</i> (Carvalho et al. 2017), <i>Oncorhynchus mykiss</i> e <i>Melanotaenia fluviatilis</i> (Taslina et al. 2022).

Organismos testes e condições experimentais

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados com girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). Os girinos foram obtidos a partir de desovas coletadas em lago situado no Campus Erechim da UFFS, Erechim, RS, Brasil. As desovas foram coletadas e levadas imediatamente para o Laboratório de Ecologia e Conservação para aclimação em aquários de 15 litros em solução FETAX (625 mg NaCl L⁻¹, 96 mg NaHCO₃ L⁻¹, 30 mg KCl L⁻¹, 15 mg CaCl₂ L⁻¹, 60 CaSO₄ L⁻¹ e 75 mg MgSO₄ L⁻¹) (ASTM 1439-12). Os aquários contendo os animais foram mantidos em temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), com aeração constante e fotoperíodo natural de 12h claro/12h escuro. Após a eclosão, os girinos foram alimentados uma vez por dia, com ração comercial completa para peixes em flocos (Alcon Basic®).

Ao atingirem o estágio 25 de desenvolvimento (Gosner, 1960), indivíduos com comprimento de $14,14 \pm 0,3703$ mm e massa corporal de $0,037\text{g} \pm 0,0063$ foram realocados dos aquários para recipientes de vidro estéril e cilíndrico, contendo 500 ml de solução FETAX + Al ou Zn. Cada vidro foi composto por 10 girinos (densidade 1/50 ml), em triplicata, totalizando 30 indivíduos em cada tratamento. O controle foi realizado apenas com solução FETAX.

O ensaio de toxicidade foi realizado em sistema semi-estático, com duração de 14 dias (336 horas). O pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido de cada recipiente foram registrados a cada 24 horas. A sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente e eventuais girinos mortos foram retirados dos recipientes. A concentração de amônia foi registrada a cada

três dias utilizando o kit Labcon Test Amônia®. A troca da água para manutenção do sistema foi realizada a cada 72 horas.

Análise do crescimento e malformações

Após 14 dias de exposição crônica às diferentes concentrações de Al e Zn, 10 girinos aleatórios de cada concentração e do controle tiveram o comprimento corporal total medido com paquímetro universal analógico (Mitutoyo 530-140BR) e a massa corporal obtida com auxílio de uma balança analítica. Os girinos foram analisados quanto à existência ou não de malformações, por observação visual em estereomicroscópio, com avaliação do intestino, aparato bucal, padrão da cauda, hemorragia, curvatura da coluna e formato do corpo.

Perfil de leucócitos

Para a análise do perfil de leucócitos, os girinos foram eutanasiados em solução de lidocaína conforme descrito por CONCEA N° 23 (Da União, 2015). Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa com heparina, e distendidas por técnica convencional de esfregaço hematológico. Após secagem foram coradas pela técnica de Romanóvisky utilizando o corante panótico rápido (Bioclim©) (Schützle, 2022). Para a composição e análise do leucograma, foi realizada a contagem diferencial relativa de leucócitos (%) de 56 lâminas hematólogicas, 8 lâminas por tratamento, por microscopia de luz comum, com objetiva de 40X. Foram contados 100 leucócitos por lâmina e as células foram classificadas em cinco categorias: linfócito, neutrófilo, eosinófilo, basófilo e monócito. Foi calculada ainda a relação entre neutrófilos e linfócitos.

Este estudo segue as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul, UFFS, Erechim, RS, Brasil (n° 2949290422).

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados previamente para a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Após confirmação da distribuição normal e homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 9.5.1.

RESULTADOS

A sobrevivência dos girinos foi de 97,6% ($n = 205$) e não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). Ao final do ensaio, girinos do controle mediram em média 17,51mm e apresentaram massa de 0,065g.

Os girinos expostos ao Al não mostraram diferença no comprimento do corpo em relação ao tratamento controle ($F_{3,36} = 1,841$, $p = 0,1572$) (Figura 1). A exposição ao Zn proporcionou maior crescimento dos girinos ($F_{3,36} = 8,71$, $p = 0,0002$), principalmente nas maiores concentrações. Os girinos apresentaram maior massa corporal em comparação com os indivíduos do tratamento controle após exposição ao Al ($F_{3,36} = 7,68$, $p = 0,004$) e ao Zn ($F_{3,36} = 7,82$, $p = 0,004$) (Figura 2).

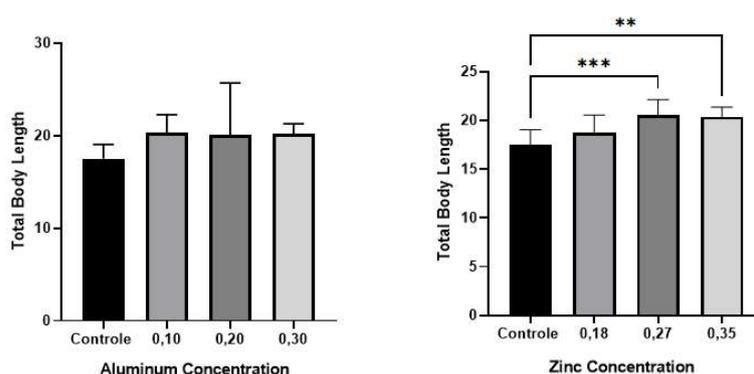


Figura 1. Comprimento corporal (mm) dos girinos de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações (mg L⁻¹) de alumínio (Al) e zinco (Zn). Barras representam médias

± DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: Zinco: ** (p=0,0010), ***(p=0,0005).

Foram observadas malformações na boca e no intestino, além de hemorragia nos indivíduos expostos aos tratamentos com Al e Zn. Considerando a porcentagem total de girinos com malformações (Tabela 2), não houve diferença entre as concentrações de Al e o controle ($F_{3,36} = 8,64$, $p = 0,1432$), mas sim para o Zn 0,27 ($F_{3,36} = 8,71$, $p = 0,0002$). Não foram observadas malformações relacionadas a curvatura da coluna, padrão da cauda ou formato do corpo nos indivíduos expostos tanto ao Al quanto ao Zn.

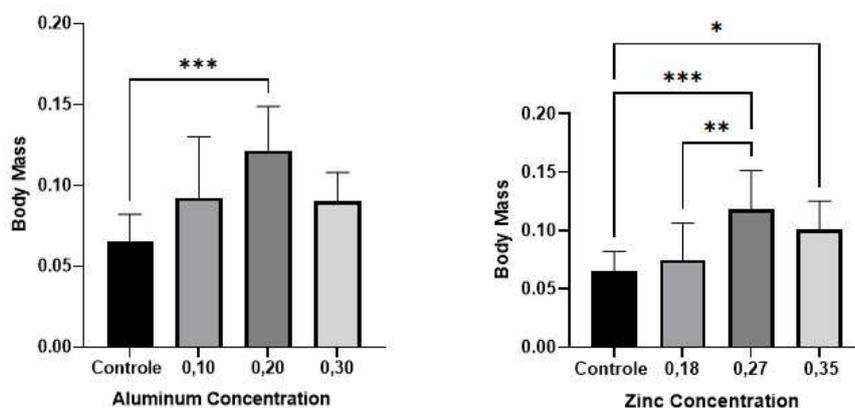


Figura 2. Massa corporal (g) dos girinos de *Physalemus cuvieri* expostos a alumínio (Al) e zinco (Zn). Barras representam médias ± DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: alumínio ***(p=0,0002) e Zinco * (p=0,0479), ** (p=0,0010), ***(P=0,0003).

Tabela 2. Malformações (%) observadas em girinos de *Physalemus cuvieri*, após 14 dias de exposição crônica a diferentes concentrações de alumínio (Al) e zinco (Zn).

	Intestino	Boca	Hemorragia	Cauda	Coluna	Total
Controle	0	0	0	0	0	0
Al (0.10 mg L ⁻¹)	3.6	0	6.6	0	0	10.2
Al (0.20 mg L ⁻¹)	3.3	0	6.6	0	0	9.9
Al (0.30 mg L ⁻¹)	10	0	3.3	0	0	13.3
Zn (0.18 mg L ⁻¹)	10	3.3	0	0	0	13.3
Zn (0.27 mg L ⁻¹)	3.3	3.3	16.7	0	0	23.3
Zn (0.35 mg L ⁻¹)	6.6	3.3	10	0	0	19.9

Observou-se a diminuição dos linfócitos (linfopenia) em relação ao grupo controle tanto para os tratamentos com Al ($F_{3,28} = 46$, $p = 0,0001$) (Figura 3) quanto para os tratamentos com Zn ($F_{3,36} = 12,77$, $p = 0,0001$) (Figura 4). Os neutrófilos aumentaram (neutrofilia), de forma geral, gradativamente após exposição ao Al ($F_{3,28} = 43,51$, $p = 0,0001$; Figura 5) e Zn ($F_{3,28} = 18,00$, $p = 0,0001$; Figura 5). Não foi observada a presença de bastonetes. Não houve diferença nos monócitos entre os diferentes tratamentos com Al ($F_{3,28} = 1,162$, $p = 0,3417$) nem nos tratamentos com Zn ($F_{3,28} = 1,469$, $p = 0,2443$). Houve um aumento gradativo na porcentagem de eosinófilos (eosinofilia) em girinos expostos ao Al ($F_{3,28} = 3,843$, $p = 0,0202$) (Figura 2). O Zn não alterou significativamente a porcentagem de eosinófilos nos girinos avaliados ($F_{3,28} = 1,052$, $p = 0,3852$) (Figura 4). Os basófilos diferiram significativamente entre os tratamentos com Al ($F_{3,28} = 6,345$, $p = 0,0020$) e Zn ($F_{3,28} = 11,35$, $p = 0,0001$), com maior porcentagem nas duas maiores concentrações testadas.

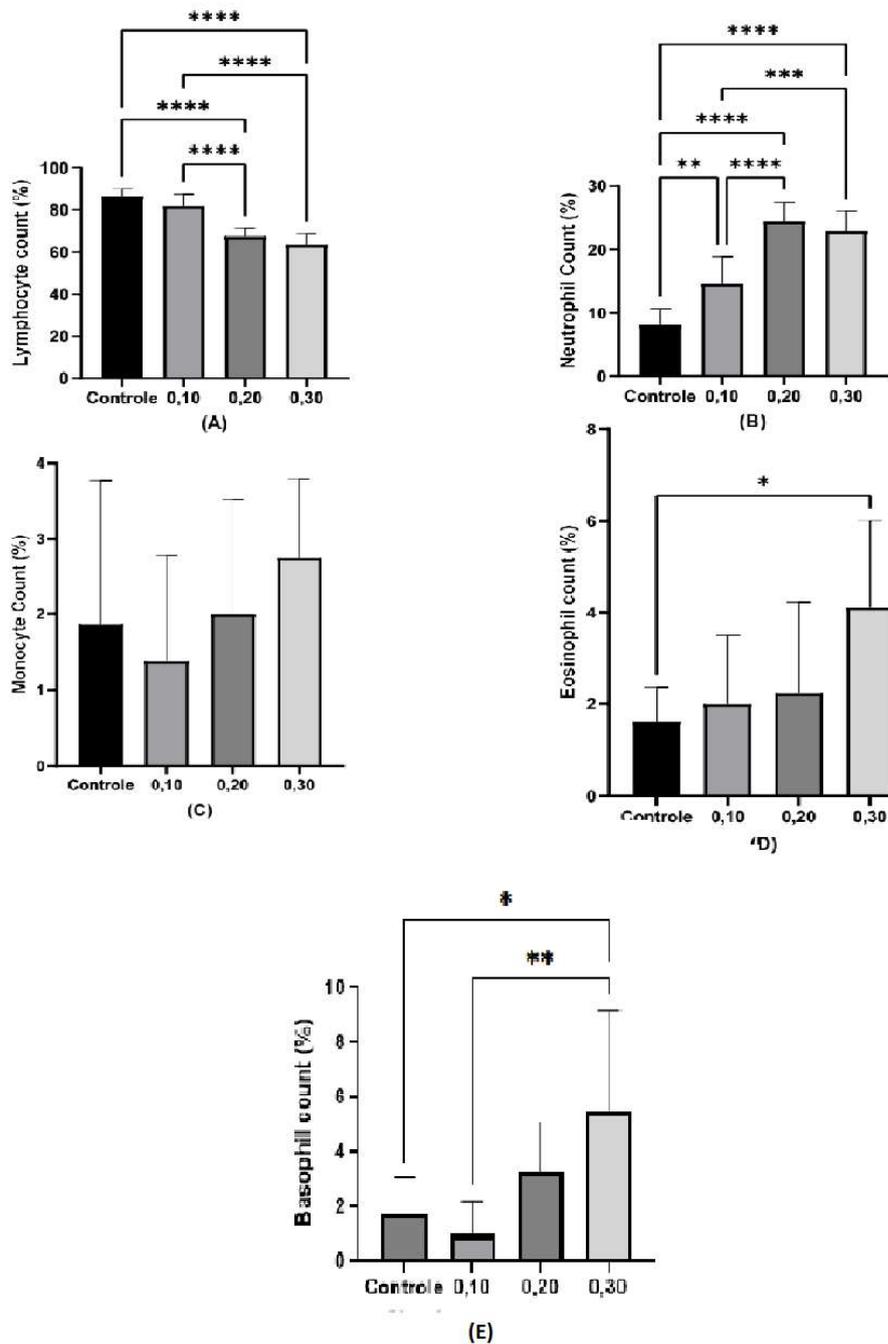


Figura 3. Contagem diferencial relativa (%) de leucócitos de *Physaulemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio (Al). Barras representam médias \pm DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: **A)** ****($P < 0,0001$), **B)** **($P = 0,0021$), ****($P < 0,0001$), **C)** ns, **D)** * ($P = 0,0208$), **E)** * ($P = 0,0113$), **($P = 0,0020$).

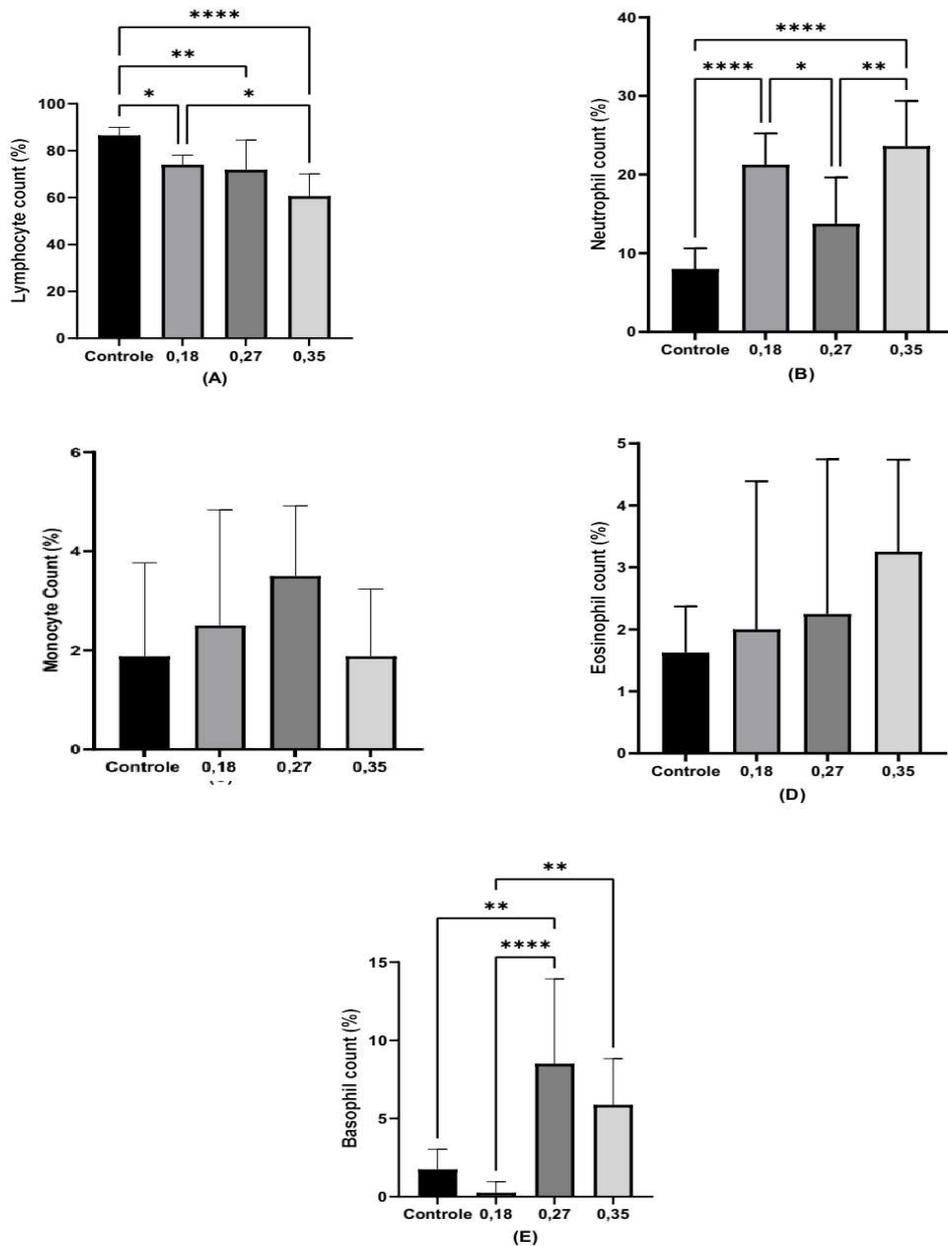


Figura 4. Contagem diferencial relativa (%) de leucócitos de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de zinco (Zn). Barras representam médias \pm DP. Representação das diferenças estatísticas entre as concentrações: **A)** * (P=0,0285), ** (P=0,0175), *** (P=0,0084), **** (P<0,0001), **B)** * (P=0,0191), ** (P=0,0015), **** (P<0,0001), **C)** ns, **D)** ns, **E)** ** (P=0,0068), **** (P<0,0001).

Houve aumento da razão neutrófilo-linfócito (N/L) dos girinos de *P. cuvieri* com o aumento das concentrações de Al ($F_{3,28} = 44,41$, $p < 0,0001$) e Zn ($F_{3,28} = 12,03$, $p < 0,0001$) avaliadas (Figura 5).

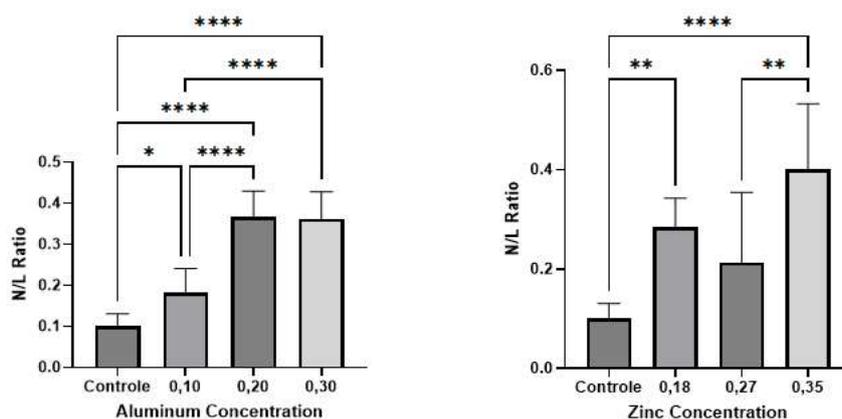


Figura 5.
Razão

Neutrófilo/Linfócito na amostra de sangue de *Physalemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio (Al) e zinco (Zn). Barras representam médias \pm DP. Diferenças estatísticas: Alumínio * ($P=0,0113$), **** ($P<0,0001$) e Zinco **($P=0,00053$) **** ($P<0,0001$).

Os linfócitos foram os leucócitos basais mais numerosos na contagem diferencial, seguido pelos neutrófilos, como segundo grupo celular mais abundante (Tabela 3). Os monócitos, eosinófilos e basófilos apresentaram valores inferiores a 2%. Os leucócitos basais de *P. cuvieri* demonstram estar dentro da faixa observada para outros anfíbios (Tabela 3)

Tabela 3. Resumo do perfil leucocitário relativo (%) das diferentes espécies de anuros bioindicadores, Família Leptodactylidae. LI, linfócitos; NE, neutrófilos; MO, monócitos; OE, eosinófilos; BA, basófilos; N/L Razão neutrófilo/linfócito.

Species	LI	NE	MO	EO	BA	N/L	Referência
<i>Physalaemus cuvieri</i>	86,5	8	1,88	1,63	1,75	0,1	Este Estudo
<i>Physalaemus cuvieri</i>	76,5	4,8	9,7	8,8	0,1	-	Garcia Neto et al. (2020)
<i>Leptodactylus latrans</i>	86,9	6,1	2,6	1,2	3	0,008	Brodeur et al. (2020)
<i>Leptodactylus luctator</i>	80,24	7,62	4,28	4,76	2,6	0,09	Bilhalva et al. (2023)
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	64,72	10,48	6,89	2,65	0,89	-	Franco-Belussi et al. (2022)

Discussão

Os anfíbios são animais sensíveis a variação na qualidade do ambiente, sobretudo a presença de poluentes químicos, como compostos metálicos (Priyadarshani et al. 2015, Patar et al. 2021, Motta et al. 2022;). Nossos dados demonstraram que *P. cuvieri* foi capaz de sobreviver em ambientes com baixa concentração de Al e Zn, dentro da faixa permitida em resolução colegiada brasileira (Brasil, 2005). O Al é um dos coagulantes inorgânicos mais utilizados no mundo e, por consequência, um dos metais de formulação comercial que mais invadem os corpos hídricos (Silva et al. 2020). O aumento da massa e comprimento corporal de *P. cuvieri* pode indicar uma plasticidade hormonal de acordo com as características físico e química da água (Marion, 2022), em um contato inicial com esses metais. Esses ajustes fisiológicos foram descritos por serem compatíveis com o encurtamento de período metamórfico, uma resposta adaptativa às condições estressantes como observado em *Lithobates catesbeianus* exposto ao lítio e ao selênio (Vidal et al. 2021).

No entanto, apesar da baixa mortalidade, a presença de metais, principalmente o Zn, causou importantes alterações morfológicas, como malformação na boca e no intestino de girinos de *P. cuvieri*. A alteração nessas estruturas pode comprometer as taxas de crescimento a longo prazo por afetar a sua capacidade de obter alimentos (Annibale et al. 2020, Zhao et al. 2019) e, conseqüentemente, sua sobrevivência durante o período larval (Pérez-Iglesias et al. 2015). Isso ocorre uma vez que os dentes labiais, presentes nas estruturas orais dos girinos,

são utilizados para raspar os alimentos e contribuem para uma maior eficiência no forrageamento (Venesky et al. 2013, Tolledo et al. 2014). A integridade estrutural do intestino garante a absorção eficiente dos nutrientes que é importante para o desenvolvimento dos animais (Chin et al. 2017, Sun et al. 2018). Assim, malformações na boca e no intestino de girinos podem causar uma alimentação inadequada e reduzida, comprometer a absorção dos alimentos e resultar em maior risco de predação (Tolledo et al. 2014, Jones et al. 2015, Bach 2016). Além disso, os metais podem ter a capacidade de interferir em estruturas ainda em desenvolvimento provavelmente porque interferem de alguma forma nas relações hormonais do eixo tireoidiano, que causam malformações em girinos, e promovem problemas na homeostase dos indivíduos na fase adulta (Bronchain et al. 2017).

Os dados basais de leucócitos de *P. curvieri* foram em geral semelhantes aos relatados para outras espécies de anfíbios (Tabela 3). A interpretação de parâmetros leucocitários são sempre um desafio para animais selvagens, visto que não existem valores de referência. Trabalhos de cunho comparativos são necessários na tentativa de entender a importância biológica, ecológica e clínica dos leucogramas de estresse (Davis et al. 2008). Os linfócitos foram as células mais numerosas entre os leucócitos (Brodeu et al. 2020, Bilhalva et al. 2023, Zhelev et al. 2015), o que sugere que esse tipo celular tenha protagonismo na resposta imunológica (Fathina et al. 2020). *Physalaemus curvieri* apresentou variação no tamanho dos linfócitos, com linfócitos pequenos e grandes, como já relatado em outras espécies de anuros (Silva et al. 2017). Essa variação fisiológica desfavorece ao analista chegar à conclusão mais assertiva sobre a existência de linfócitos atípicos ou de linfócito reativo, sendo necessário estudos adicionais voltados para esse tipo celular em específico.

A neutrofilia é referenciada como consequência de injúrias protagonizada pelos agentes estressores. Os neutrófilos são células fagocitárias recrutadas na defesa contra local afetado por quininas, relacionados a resposta imunológica não específica (Witeska et al. 2022). Estas células se tornam ativadas quando se ligam a peptídeos de superfície de patógenos ou pela ativação relacionada ao estresse de seus receptores α - e β -adreno -adreno- e glicocorticóides (Huber et al. 2019).

Os monócitos são células que migram do sangue periférico para os tecidos inflamados e neles diferenciam-se em macrófago, podendo significar uma resposta citotóxica a presença de diferentes estressores químicos (Zanoniet al. 2019). Os monócitos ainda respondem aos diferentes ambientes modulando a produção de citocinas (Groeneweg et al. 2020) que são responsáveis pela aceleração do processo inflamatório que se revertem em estresse oxidativo (Huang et al. 2020). Assim, o aumento na porcentagem de monócitos, denominada monocitose, parece ser efeito da mudança de uma população marginalizada de monócitos para uma população circulante associada a uma resposta ao estresse por uma alta concentração de hormônios esteroides, como os glicocorticoides (Silva et al. 2008), permitindo uma avaliação tanto em estresses agudos quanto crônicos (Grzelak et al. 2017).

O aumento na porcentagem de eosinófilos e basófilos após exposição ao Al e de eosinófilos após a exposição ao Zn, principalmente nas maiores concentrações, em indivíduos de *P. cuvieri* são importantes marcadores de estresse. Os eosinófilos são células efetoras em distúrbios alérgicos e infecções helmínticas, e apresentam um papel importante em respostas imunoregulatórias (Stone et al. 2010), embora a sua função no sistema imunológico inato não tenha sido elucidada. Em anfíbios, especificadamente, os eosinófilos atuam no processo de lise tecidual, desempenhando um papel importante na metamorfose desses indivíduos (Davis e Maerz, 2008). A eosinofilia também foi observada em anfíbios de *Odontophrynus carvalhoi* exposto ao pesticida organofosforado clorpirifós (Silva et al. 2020), e *Lithobates catesbeianus* expostos aos fármacos acetato de ciproterona e (De Gregório et al. 2022) e oxitetraciclina e sulfametoxazol (Rutkoski et al. 2022). Isso sugere que a eosinofilia também represente um biomarcador para a intoxicação à diferentes substâncias químicas.

Alterações na contagem dos eosinófilos estão intrinsecamente ligadas a fisiopatologia de doenças respiratórias obstrutivas (Ferrari et al. 2022) e em doenças respiratórias induzidas por intoxicação ambiental por metais (Campos, 2023). Desta forma, é possível que os metais estudados tenham o papel de alérgenos ao sistema respiratório dos girinos, estimulando a produção de uma resposta imunológica e aumentando o número de eosinófilos circulantes (eosinofilia). Pesquisas anteriores com peixes corroboram essa ideia ao enfatizar que o principal alvo da toxicidade do Al e do Zn na água são as brânquias, e, ao se ligar ao epitélio, causam doenças respiratórias nos animais (Agbugui e Abe, 2022).

Os basófilos estão entre os leucócitos menos abundante do sistema imunológico dos vertebrados. Apesar da função dos basófilos não ser totalmente compreendida, sabe-se que eles desempenham um importante papel na vigilância e no recrutamento dos eosinófilos (Silva et al. 2017, Witeska et al. 2021). Como principais fontes de histamina em circulação, os basófilos são os responsáveis pelas reações de hipersensibilidade imediata em anafilaxia, processos respiratórios crônicos, urticária e possuem receptores de alta afinidade aos anticorpos IgE circulantes (Campos, 2022, Pereira, 2022).

A variação leucocitária, em especial de proporções N:L, é um fenômeno fisiológico que pode ser utilizado para avaliar tanto as questões ecológicas (vulnerabilidade da população e a qualidade do habitat), quanto estado de saúde animal (Litmer et al. 2020). A exposição a metais tem sido descrita por aumentar a razão N/L (Jayawardena, 2016, Santana 2021), como observado neste estudo. As razões N/L para anuros silvestres não estressados tendem a estar próximos de 0,008 – 0,032 (Tabela 3, Davis et al. 2008). Desta forma, as maiores concentrações de Al e Zn avaliadas representaram um potencial estressor nos girinos de *P. cuvieri*. As mudanças comuns na constituição dos leucócitos no sangue periférico dos animais, induzidas por estresse, inclui a diminuição dos linfócitos circulantes (linfopenia), e o aumento do influxo de neutrófilos (neutrofilia) (De Assis et al. 2015). Da mesma forma, a elevação da razão N/L é comumente apontada na literatura como indicativo de estresse relacionados aos altos níveis de glicorticóides (Brouder et al. 2020). Os glicorticóides produzidos em resposta aos estressores possuem um efeito complexo na imunocompetência dos girinos, sendo preponderantemente dependentes tanto do metal quanto da dose ao qual o animal foi exposto (Barsott, 2021).

Dentre as concentrações estudadas, a maior concentração de Al (30 mg L⁻¹) já é considerada superior ao permitido no ambiente aquático, reportado entre 0,05 mg L⁻¹ e 0,2 mg L⁻¹ por K AL Tae et al. (2020). Essa concentração causou mal formações no intestino e na provocou hemorragia, como também causou alterações no perfil leucocitário (linfopenia, neutrofilia, eosinofilia e basofilia), em girinos de *P. cuvieri*. Já no caso do Zn, a concentração permitida na legislação brasileira (0,18 mg L⁻¹, BRASIL, 2005) foi reportada por causar mortalidade e malformações no peixe *Pagrus maior*, associada à baixa taxa de eclosão, deformidades na coluna vertebral e cauda, edema pericárdico, hemorragia visceral e alta

mortalidade (Taslíma et al. 2023). Em girinos de *Fejervarya limnocharis* a exposição subletal de Zn alterou significativamente o comprimento corporal e o peso corporal na metamorfose, além de demonstrar potencial genotóxico a afetar sobrevivência dos indivíduos (PATAR et al. 2021).

Conclusões

Os resultados deste trabalho evidenciam que as concentrações ambientalmente relevantes e permitidas pelas resoluções brasileiras não são letais a *P. curvieri* mas são capazes de gerar consequências negativas no desenvolvimento e fisiologia dos indivíduos. O encurtamento da fase larval e alterações no perfil de leucócitos, principalmente, indicam a possibilidade de efeitos negativos aos indivíduos na fase adulta, após exposição aos metais. Isso acende um alerta para que mais estudos sejam realizados, inclusive com concentrações de metais superiores às prescritas pelo CONAMA, para garantir a conservação da espécie.

Referências

- Agbugui, M. O. and Abe, G. O. 2022 “Heavy Metals in Fish: Bioaccumulation and Health.” *British Journal of Earth Sciences Research* 10 (1): 47–66. doi.org/10.37745/bjesr.2013/vol10no1pp.47-66
- Allender, M. C. and Fry, M. M. 2008. “Amphibian Hematology.” *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 11 (3): 463–480. doi: 10.1016/j.cvex.2008.03.006.
- Annibale, F.S. de Sousa, V.T.T. de Sousa, C.E. Venesky, M.D. Rossa-Feres, D. de C. Wassersug, R.J. and Nomura, F. 2020. “Smooth, Striated, or Rough: How Substrate Textures Affect the Feeding Performance of Tadpoles with Different Oral Morphologies.” *Zoomorphology* 139 (1): 97–110. doi: 10.1007/s00435-019-00469-x.
- Arikan, H. and Cicek, K. 2014. “Hematology of Amphibians and Reptiles: A Review.” *North-Western Journal of Zoology* 10 (1): 190-209.
- ASTM E1439. “American Society for Testing, Materials Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay–Xenopus (FETAX).” Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia.
- Bach, N.C. Natale, G.S. Somoza, G.M. and Ronco, A.E. 2016. “Effect on the Growth and Development and Induction of Abnormalities by a Glyphosate Commercial Formulation and Its Active Ingredient during Two Developmental Stages of the South-American Creole Frog, *Leptodactylus latrans*.” *Environmental Science and Pollution Research* 23 (23): 23959–23971. doi: 10.1007/s11356-016-7631-z.
- Barsotti, S. Cavazzana, I. Zanframundo, G. Neri, R. Taraborelli, M. Cioffi, E. Cardelli, C. Tripoli, A. Codullo, V. Tincani, A. Cavagna, L. Franceschini, F. and Mosca, M. 2021. “Real Life Picture of the Use of Intravenous Immunoglobulins in Idiopathic Inflammatory Myopathies: Results of a Multicentric Study.” *Autoimmunity Reviews* 20 (3): 102757. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102757.
- Bilhalva, L.C. de Almeida, B.A. Colombo, P. de Faria Valle, S. and Soares, J.F. 2023. “Hematologic Variables of Free-Living *Leptodactylus luctator* with and without Hemoparasites and *Thrombidiform mites* in Southern Brazil.” *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 38 (February): 100834. doi: 10.1016/j.vprsr.2023.100834.
- Brasil. 2005. “Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005”. Conselho Nacional de Meio Ambiente Available at: http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf. Accessed on 09 Oct 2023.
- Brodeur, J.C. Bahl, M.F. Natale, G.S. and Poliserpi, M.B. 2020. “Biomarker and Hematological Fieldwork with Amphibians: Is It Necessary to Sample All Night?” *Environmental Science and Pollution Research* 27 (14): 17152–17161. doi: 10.1007/s11356-020-08313-2.
- Bronchain, O.J. Chesneau, A. Monsoro-Burq, A.-H. Jolivet, P. Paillard, E. Scanlan, T.S. Demeneix, B.A. Sachs, L.M. and Pollet, N. 2017. “Implication of Thyroid Hormone Signaling in Neural Crest Cells Migration: Evidence from Thyroid Hormone Receptor Beta Knockdown and NH3 Antagonist Studies.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 439 (January): 233–246. doi: 10.1016/j.mce.2016.09.007.
- Burraco, P. Díaz-Paniagua, C. and Gomez-Mestre, I. 2017. “Different Effects of Accelerated Development and Enhanced Growth on Oxidative Stress and Telomere Shortening in Amphibian Larvae.” *Scientific Reports* 7 (1): 7494. doi: 10.1038/s41598-017-07201-z.

- Campos, L. 2022. “Teste de Ativação de Basófilos Como Biomarcador Para o Diagnóstico de Reações de Hipersensibilidade Aos Taxanos.” São Paulo: Universidade de São Paulo. doi: 10.11606/T.5.2022.tde-30092022-102918.
- Carvalho, C. dos S. Moraes Utsunomiya, H.S. Pasquoto-Stigliani, T. Costa, M.J. and Fernandes, M.N. 2020. “Biomarkers of the Oxidative Stress and Neurotoxicity in Tissues of the Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to Assess Exposure to Metals.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 196: 110560. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110560.
- Carvalho, M. M. Lira, V. S. Watanabe, C. H. and Fracácio, R. 2017. “Estudo Da Toxicidade de Metais (Zinco e Cádmiio) Sobre *Ceriodaphnia dubia*, Por Multivias de Exposição e Recuperação Biológica de Descendentes.” *Engenharia Sanitaria e Ambiental* 22 (5): 961–968. doi: 10.1590/s1413-41522017158722.
- Chagas, B.R.C. Utsunomiya, H.S.M. Fernandes, M.N. and Carvalho, C.S. 2020. “Metabolic Responses in Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after Exposure to Zinc, Copper and Cadmium.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 233 (July): 108768. doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108768.
- Chin, A.M. Hill, D.R. Aurora, M. and Spence, J.R. 2017. “Morphogenesis and Maturation of the Embryonic and Postnatal Intestine.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 66 (June): 81–93. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.011.
- Closset, M. Cailliau, K. Slaby, S. and Marin, M. 2021. “Effects of Aluminium Contamination on the Nervous System of Freshwater Aquatic Vertebrates: A Review.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (1): 31. doi: 10.3390/ijms23010031.
- Da União. 2018. “Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018.” Coordenadoria Nacional de Controle de Experimentação Animal. Ministério Da Ciência, Tecnologia e Inovação. Available at: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_37_de_15022018.html. Accessed on 29 Oct 2023.
- Davis, A. K. and Maerz, J. C. 2008. “Sex-Related Differences in Hematological Stress Indices of Breeding Paedomorphic Mole Salamanders.” *Journal of Herpetology* 42 (1): 197–201. doi: 10.1670/06-277R2.1.
- Davis, A. K. and Maney, D. L. 2018. “The Use of Glucocorticoid Hormones or Leucocyte Profiles to Measure Stress in Vertebrates: What’s the Difference?” Edited by Erica Leder. *Methods in Ecology and Evolution* 9 (6): 1556–1568. doi: 10.1111/2041-210X.13020.
- Davis, A. K. D. L. Maney, and J. C. Maerz. 2008. “The Use of Leukocyte Profiles to Measure Stress in Vertebrates: A Review for Ecologists.” *Functional Ecology* 22 (5): 760–772. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x.
- Davis, A. K. 2009. “Metamorphosis-Related Changes in Leukocyte Profiles of Larval Bullfrogs (*Rana catesbeiana*).” *Comparative Clinical Pathology* 18 (2): 181–186. doi: 10.1007/s00580-008-0773-8.
- de Assis, V. R. Titon, S. C. M. Barsotti, A. M. G. Titon Jr. B. and Gomes, F. R. 2015. “Effects of Acute Restraint Stress, Prolonged Captivity Stress and Transdermal Corticosterone Application on Immunocompetence and Plasma Levels of Corticosterone on the Cururu Toad (*Rhinella icterica*).” Edited by Hubert Vaudry. *PLOS ONE* 10 (4): e0121005. doi: 10.1371/journal.pone.0121005.
- de Gregorio, L. S. Franco-Belussi, L. and De Oliveira, C. 2021. “Leukocyte Profile of Tadpoles and Juveniles of *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (Anura) and the Effects of

- Nonylphenol and Cyproterone Acetate.” *South American Journal of Herpetology* 20 (1). doi: 10.2994/SAJH-D-19-00111.1.
- Fathinia, B. Minaei, T. Javanbakht, H. and Shafaei-Pour, A. 2020. Haematology of the Levant Green Frog, *Pelophylax bedriagae* (Amphibia: Ranidae) in Southern Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* 16 (2): 155–170. doi: [10.22067/IJAB.V16I2.85390](https://doi.org/10.22067/IJAB.V16I2.85390).
- Ferrari, M. Pizzini, M. Cazzoletti, L. Ermon, V. De Marchi, S. Giuseppe Dalle Carbonare, L. Crisafulli, E. and Spelta, F. 2022. “Circulating Eosinophil Levels and Lung Function Decline in Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Retrospective Longitudinal Study.” *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, November, e20220183. doi: 10.36416/1806-3756/e20220183.
- Franco-Belussi, L. Provete, D.B. Leão, T. R. F. Siqueira, M. S. Valverde, B. S. L. Martins, B. O. Oliveira, C. and Fernandes, C. E. 2022. “Hematological Parameters of a Neotropical Wild Frog Population, with a Phylogenetic Perspective on Blood Cell Composition in Anura. *Current Zoology* 68(3): 361–369. doi: 10.1093/cz/zoab059.
- Frost, D. R. 2023. “Amphibian Species of the World: an Online Reference.” Version 6.2 (Date of access). Available at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2023. doi.org/10.5531/db.vz.0001.
- Garcia Neto, P. G. Nowakowski, A. J. da Silva, A. F. C. Oliveira, O. C. C. Guerra, R. N. M. anf de Andrade, G. V. 2020. “Leukocyte Profiles of Two Neotropical Anuran Species Affected by Anthropogenic Habitat Alteration.” *Animal Conservation* 23 (5): 524–532. doi: 10.1111/acv.12564.
- Gárriz Á. And Miranda L. A. 2020. Effects of Metals on Sperm Quality, Fertilization and Hatching Rates, and Embryo and Larval Survival of Pejerrey Fish (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicology* 29: 1072–1082. doi: 10.1007/s10646-020-02245-w.
- Goessling, J.M. Kennedy, H. Mendonça, M.T. and Wilson, A.E. 2015. “A Meta-analysis of Plasma Corticosterone and Heterophil: Lymphocyte Ratios – Is There Conservation of Physiological Stress Responses over Time?” Edited by Jennifer Grindstaff. *Functional Ecology* 29 (9): 1189–1196. doi: 10.1111/1365-2435.12442.
- Gomes, A. R. Guimarães, A. T. B. de Matos, L. P. Silva, A. M. de Lima Rodrigues, A. S. de Oliveira Ferreira, R. ... & Malafaia, G. (2023). “Potential Ecotoxicity of Substrate-Enriched Zinc Oxide Nanoparticles to *Physalaemus cuvieri* Tadpoles.” *Science of The Total Environment* 873: 162382. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162382.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16(3): 183–190.
- Groeneweg, L. Hidalgo, A. and A-Gonzalez, N. 2020. “Emerging Roles of Infiltrating Granulocytes and Monocytes in Homeostasis.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (19): 3823–3830. doi: 10.1007/s00018-020-03509-8.
- Grzelak, A. K., Davis, D. J., Caraker, S. M., Crim, M. J., Spitsbergen, J. M., & Wiedmeyer, C. E. (2017). Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Medicine*, 67(3), 263-269.
- Guo, R. Zhang, W. Yang, Y. Ding, J. Ai, S. Yang, W. Bai, X. and Zhang, Y. 2018a. “Sperm Morphology and Motility of *Bufo raddei* Under Long-Term Environmental Heavy Metal Stress.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 101 (3): 305–313. doi: 10.1007/s00128-018-2408-3.

- Guo, R. Zhang, W. Yang, Y. Ding, J. Yang, W. and Zhang, Y. 2018b. "Variation of Fitness and Reproductive Strategy in Male *Bufo raddei* under Environmental Heavy Metal Pollution." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164 (November): 253–260. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.035.
- Herek, J. S. Vargas, L. Rinas Trindade, S. A. Rutkoski, C. F. Macagnan, N. Hartmann, P. A. and Hartmann, M.T. 2021. "Genotoxic Effects of Glyphosate on *Physalaemus* Tadpoles." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 81: 103516. doi: 10.1016/j.etap.2020.103516.
- Herkovits, J. Castañaga, L. A. D'Eramo, J. L. and Jourani, V. P. 2015. "Living Organisms Influence on Environmental Conditions: PH Modulation by Amphibian Embryos versus Aluminum Toxicity." *Chemosphere* 139: 210–215. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.05.025.
- Huang, X., He, C., Hua, X., Kan, A., Mao, Y., Sun, S., ... & Li, S. (2020). Oxidative stress induces monocyte-to-myofibroblast transdifferentiation through p38 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical and Translational Medicine*, 10(2), e41. <https://doi.org/10.1002/ctm2.41>
- Huber, N. Marasco, V. Painer, J. Vetter, S.G. Göritz, F. Kaczensky, P. and Walzer, C. 2019. "Leukocyte Coping Capacity: An Integrative Parameter for Wildlife Welfare Within Conservation Interventions." *Frontiers in Veterinary Science* 6. doi: 10.3389/fvets.2019.00105.
- Jayawardena, U. A. Ratnasooriya, W. D. Wickramasinghe, D. D. and Udagama, P. V. 2016. Heavy Metal Mediated Innate Immune Responses of the Indian Green Frog, *Euphlyctis hexadactylus* (Anura: Ranidae): Cellular Profiles and Associated Th1 Skewed Cytokine Response. *Science of the Total Environment* 566: 1194–1204. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136554.
- Jones, S. K. C. Munn, A. J. Penman, T. D. and Byrne, P. G. 2015. "Long-Term Changes in Food Availability Mediate the Effects of Temperature on Growth, Development and Survival in Striped Marsh Frog Larvae: Implications for Captive Breeding Programmes." *Conservation Physiology* 3 (1): cov029. doi: 10.1093/conphys/cov029.
- K. AL Tae, S. H. K. and Kh. Ismail, H. 2020. "Review On Some Heavy Metals Toxicity On Freshwater Fishes." *Journal of Applied Veterinary Sciences*, July, 78–86. doi: 10.21608/javs.2020.100157.
- Le Saux, A. David, E. Betoulle, S. Bultelle, F. Rocher, B. Barjhoux, I. and Cosio, C. 2020. "New Insights into Cellular Impacts of Metals in Aquatic Animals." *Environments* 7 (6): 46. doi: 10.3390/environments7060046.
- Litmer, A.R. Freake, M. and Murray, C.M. 2020. "Neutrophil: Lymphocyte Ratios as a Measure of Chronic Stress in Populations of the Hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) across a Habitat Quality Gradient." *Copeia* 108 (2): 403. doi: 10.1643/CP-19-265.
- Mani, M. Altunışık, A. and Gedik, K. 2022. "Bioaccumulation of Trace Elements and Health Risk Predictions in Edible Tissues of the Marsh Frog." *Biological Trace Element Research* 200 (10): 4493–4504. doi: 10.1007/s12011-021-03017-1.
- Maret, W. 2016. "The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 66. doi: 10.3390/ijms17010066.

- Marion, G. A. N. 2023. “Toxicologia de Anfíbios *in situ*: Levantamento Bibliográfico e Estudo de Caso com Girinos de *Leptodactylus luctator*.” Erechim: Universidade Federal da Fronteira Sul.
- Mason, R. 2013. “Immune Suppression by Neonicotinoid Insecticides at the Root of Global Wildlife Declines.” *Journal of Environmental Immunology and Toxicology* 1 (1): 3. doi: 10.7178/jeit.1.
- Massoud, E. El-Kott, A. Morsy, K. and Abdel-Khalek, A.A. 2021. “Assessment of Hepatotoxicity Induced by Aluminum Oxide Nanoparticles in *Oreochromis niloticus* Using Integrated Biomarkers: Exposure and Recovery.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 106 (6): 970–977. doi: 10.1007/s00128-021-03190-y.
- Miranda, L.A. and Somoza, G.M. 2022. “Effects of Anthropogenic Pollutants Identified in Pampas Lakes on the Development and Reproduction of Pejerrey Fish *Odontesthes bonariensis*.” *Frontiers in Physiology* 13 (July). doi: 10.3389/fphys.2022.939986.
- Motta, A.G.C. Guerra, V. do Amaral, D.F. da Costa Araújo, A.P. Vieira, L.G. de Melo e Silva, D. and Rocha, T.L. 2022. “Assessment of Multiple Biomarkers in *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) Tadpoles Exposed to Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Chloride: Integrating Morphological and Behavioral Approaches to Ecotoxicology.” *Environmental Science and Pollution Research* 30 (5): 13755–13772. doi: 10.1007/s11356-022-23018-4.
- Moschem, J. C. & Gonçalves, P. R. 2020. “Impact of Heavy Metals: An Analysis of Biochemical and Cellular Effects.” *Health and Biosciences* 1 (2): 88–100.
- Patar, A. Das, I. Giri, S. and Giri, A. 2021. “Zinc Contamination is an Underestimated Risk to Amphibians: Toxicity Evaluation in Tadpoles of *Fejervarya limnocharis*.” *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 29 (4): 489–498. doi: 10.3846/jeelm.2021.15814.
- Patra, R.W. Chapman, J.C. Lim, R.P. Gehrke, P.C. and Sunderam, R.M. 2015. “Interactions between Water Temperature and Contaminant Toxicity to Freshwater Fish.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 34 (8): 1809–1817. doi: 10.1002/etc.2990.
- Pavan, F. A. Samojeden, C. G. Rutkoski, C. F. Folador, A. Da Fré, S. P. Müller, C. Hartmann, P. A. and Hartmann, M.T. 2021. “Morphological, Behavioral and Genotoxic Effects of Glyphosate and 2,4-D Mixture in Tadpoles of Two Native Species of South American Amphibians.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 85 (July): 103637. doi: 10.1016/j.etap.2021.103637.
- Pereira, H. 2022. “Avaliação Hematológica e Histopatológica de Neoplasia de Oviduto Em Jararaca-Do-Norte Bothrops Atrox de Cativoiro.” Universidade Federal de Uberlândia. doi: 10.14393/ufu.te.2022.5355.
- Pérez-Iglesias, J. M. Soloneski, S. Nikoloff, N. Natale, G. S. and Larramendy, M. L. 2015. “Toxic and Genotoxic Effects of the Imazethapyr-Based Herbicide Formulation Pivot H® on Montevideo Tree Frog *Hypsiboas pulchellus* Tadpoles (Anura, Hylidae).” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119 (September): 15–24. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.045.
- Priyadarshani, S. Madhushani, W. A. N. Jayawardena, U. A. Wickramasinghe, D. D. and Udagama, P. V. 2015. “Heavy Metal Mediated Immunomodulation of the Indian Green Frog, *Euphlyctis hexadactylus* (Anura:Ranidae) in Urban Wetlands.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 116 (June): 40–49. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.02.037.

- Rodrigues, C. L. da Silva, T. B. Klein, W. and dos Santos Fernandes, M. 2020. “Analysis of Abiotic Factors Associated with Foam Nests of Cuvier’s Foam Froglet (*Physalaemus cuvieri*) in Southeastern Brazil.” *Neotropical Biology and Conservation* 15 (4): 675–688. doi: 10.3897/neotropical.15.e57804.
- Rutkoski, C. F. Grott, S. C. Israel, N. G. Carneiro, F. E. de Campos Guerreiro, F. Santos, S. Horn, P. A. Trentini, A. A. Barbosa da Silva, E. Coelho de Albuquerque, C. A. Alves, T. C. and Alves de Almeida, E. 2022. “Hepatic and Blood Alterations in *Lithobates catesbeianus* Tadpoles Exposed to Sulfamethoxazole and Oxytetracycline.” *Chemosphere* 307: 136215. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136215.
- Rutkoski, C. F. Macagnan, N. Folador, A. Skovronski, V. J. do Amaral, A. M. B. Leitemperger, J. Costa, M. D. Hartmann, P. A. Müller, C. Loro, V. L. and Hartmann, M.T. 2020. “Morphological and Biochemical Traits and Mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) Tadpoles Exposed to the Insecticide Chlorpyrifos.” *Chemosphere* 250 (July): 126162. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126162.
- Samojeden, C. G. Pavan, F. A. Rutkoski, C. F. Folador, A. da Fré, S. P. Müller, C. Hartmann, P. A. and Hartmann, M. 2022. “Toxicity and Genotoxicity of Imidacloprid in the Tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae).” *Scientific Reports* 12 (1): 11926. doi: 10.1038/s41598-022-16039-z.
- Santana, E. Schiesari, L. Gomes, F. and Martins, M. 2021. “Morphophysiological Traits of an Amphibian Exposed to Historical Industrial Pollution in a Brazilian Biodiversity Hotspot.” *Amphibia-Reptilia* 42 (3): 283–295. doi: 10.1163/15685381-bja10050.
- Schützler, R. C. 2022. “Estudo comparativo entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa dentro de uma rotina laboratorial.” *Revista de Extensão e Iniciação Científica da Unisociesc* 9(2): 1–18.
- Silva, R., Almeida Júnior, G. S., Cury, J. R. M., Amaral, R. A., Perenha, R. A., Locatelli, L., ... & SACCO, S. R. (2008). Leucograma de estresse. *Garça-SP: Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*.
- Silva, M. B. da, Fraga, R. E. Nishiyama, P. B. Silva, I. S. S. da, Costa, N. L. B. de Oliveira, L. A. A. Rocha, M. A. and Juncá, F. A. 2020. “Leukocyte Profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) Tadpoles Exposed to Organophosphate Chlorpyrifos Pesticides.” *Water, Air, & Soil Pollution* 231 (7): 372. doi: 10.1007/s11270-020-04726-4.
- Silva, S. M. R. Ewbank, A. C. Strefezzi, R. D. F. Alvarado, G. Sacristan, C. Paula, C. D. and Catão-Dias, J.L. 2017. “Comparative Leukocyte Morphometric Analysis between Endemic Anurans from Brazil and the Invasive Species *Lithobates catesbeianus*.” *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 54 (2): 159. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.121887.
- Slaninova, A. Machova, J. and Svobodova, Z. 2014. “Fish Kill Caused by Aluminium and Iron Contamination in a Natural Pond Used for Fish Rearing: A Case Report.” *Veterinárni Medicina* 59 (11): 573–581. doi: 10.17221/7821-VETMED.
- Smalling, K.L. Oja, E.B. Cleveland, D.M. Davenport, J.M. Eagles-Smith, C. Campbell Grant, E.H. Kleeman, P.M. Halstead, B.J. Stemp, K.M. Tornabene, B.J. Bunnell, Z.J. and Hossack, B.R. 2021. “Metal Accumulation Varies with Life History, Size, and Development of Larval Amphibians.” *Environmental Pollution* 287 (October): 117638. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117638.

- Stone, K.D. Prussin, C. and Metcalfe, D.D. 2010. "IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2): S73–S80. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.017.
- Sumanasekara, V. D. W. Dissanayake, D. M. M. R. and Seneviratne, H. T. J. 2015. "Review on Use of Amphibian Taxa as a Bio-Indicator for Watershed Health and Stresses. In NBRO Symposium Proceeding 5(1). Available at https://www.nbro.gov.lk/images/content_image/pdf/symposia/32.pdf. Accessed on 07 Oct 2023.
- Sun, Y. Zhang, J. Song, W. and Shan, A. 2018. "Vitamin E Alleviates Phoxim-Induced Toxic Effects on Intestinal Oxidative Stress, Barrier Function, and Morphological Changes in Rats." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (26): 26682–26692. doi: 10.1007/s11356-018-2666-y.
- Taslina, K. Al-Emran, M. Rahman, M.S. Hasan, J. Ferdous, Z. Rohani, M.F. and Shahjahan, M. 2022. "Impacts of Heavy Metals on Early Development, Growth and Reproduction of Fish – A Review." *Toxicology Reports* 9: 858–868. doi: 10.1016/j.toxrep.2022.04.013.
- Tolledo, J. Silva, E. T. Nunes-De-Almeida, C. H. L. and Toledo, L. F. 2014. "Anomalous Tadpoles in a Brazilian Oceanic Archipelago: Implications of Oral Anomalies on Foraging Behaviour, Food Intake and Metamorphosis." *The Herpetological Journal* 24: 237–243.
- Venesky, M. D. Rossa-Feres, D. Nomura, F. Vasconcellos de Andrade, G. Pezzuti, T. L. Tsutae de Sousa, V. T. Anderson, C. V. and Wassersug, R.J. 2013. "Comparative Feeding Kinematics of Tropical Hylid Tadpoles." *Journal of Experimental Biology*, January. doi: 10.1242/jeb.082040.
- Vidal, F. A. P. Abdalla, F. C. Carvalho, C. dos S. Moraes Utsunomiya, H. S. Teixeira Oliveira, L. A. Salla, R. F. and Jones-Costa, M. 2021. "Metamorphic Acceleration Following the Exposure to Lithium and Selenium on American Bullfrog Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207: 111101. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111101.
- Vidya P. V. and Chitra K. C. 2018. "Aluminium Oxide Nanoparticles Induced Irrevocable Damages in Gill, Liver and Brain Tissues of the Freshwater Fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852)." *International Journal of Fisheries and Aquatic Research* 3(2): 13–17.
- Witeska, M. Kondera, E. Ługowska, K. Bojarski, B. 2022. "Hematological Methods in Fish – Not Only for Beginners." *Aquaculture* 547: 737498. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737498.
- Wrubleswski, J. Reichert, F. W. Galon, L. Hartmann, P. A. and Hartmann, M. T. 2018. "Acute and Chronic Toxicity of Pesticides on Tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae)." *Ecotoxicology* 27 (3): 360–368. doi: 10.1007/s10646-018-1900-1.
- Zanoni, M. A. Carvalho S. G. Costa F. and R. F. Seiva F. 2019. "Stress Evaluation in Dourado Females (*Salminus brasiliensis*) Submitted to Two Different Methods of Induced Spawning." *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 11 (5): 97–103. doi: 10.5897/IJFA2019.0726.
- Zhang, W. Guo, R. Ai, S. Yang, Y. Ding, J. and Zhang, Y. 2018. "Long-Term Heavy Metal Pollution Varied Female Reproduction Investment in Free-Living Anura, *Bufo raddei*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 159: 136–142. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.001.

- Zhao, T. Wang, Xiaoyi, Wang, Xungang, Wang, S. Chen, Y. and Jiang, J. 2019. “Effects of Urea on Behavior and Functional Traits of Asiatic Toad (*Bufo gargarizans*) Tadpoles.” *Aquatic Ecology* 53 (1): 9–19. doi: 10.1007/s10452-018-9669-0.
- Zhelev, Z. M. and Popgeorgiev, G. S. 2021. “Use of Haematological Indicators in Anurans for Assessing Their Health Status When Inhabiting Conditions of Anthropogenic Stress. *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as an Example: A Review and Appraisal.” *Ecologia Balkanica* 13 (2): 289–320.
- Zhong, L. He Z. Luyin W. Huijun R. Nian W. Fan Y. Zhaohui N. Xinbin D. and Yunfeng L. 2022. “Copper and Zinc Treatments Alter the Thyroid Endocrine System in Zebrafish Embryos/Larvae.” *Toxics* 10 (12): 756. doi: 10.3390/toxics10120756.

**SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE *PHYSALAEEMUS CUVIERI* (FITZINGER, 1826) A
EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ALUMÍNIO E ZINCO**

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Sobrevivência (%) em horas de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio (Al; 0,10 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹, 0,30 mg L⁻¹) e zinco (Zn; 0,18 mg L⁻¹, 0,27 mg L⁻¹, 0,35 mg L⁻¹) em teste crônico por 14 dias.

Tratamento	Sobrevivência (%)													
	24h	48h	72h	96h	120h	134h	158h	182h	206h	230h	254h	278h	302h	326h
Controle	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Al (0.10 mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Al (0.20 mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Al (0.30 mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	96.7
Zn (0.18 mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Zn (0.27 mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Zn (0.35 mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	96.7	93.3	90.0	86.7

Tabela S2. Perfil leucocitário por contagem diferencial relativa (%) de leucócitos (LE), neutrófilos (NE), monócitos (MO), eosinófilos (EO) e basófilos (BA) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de alumínio (Al 0,10 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹, 0,30 mg L⁻¹) e zinco (Zn; 0,18 mg L⁻¹, 0,27 mg L⁻¹, 0,35 mg L⁻¹) em teste crônico por 14 dias. Os dados representam valores médios ± SEM.

Tratamento	LE	NE	MO	EO	BA
Controle	86.5 ± 1.24	8.00 ± 0.93	1.88 ± 0.67	1.63 ± 0.26	1.75 ± 0.45
Al (0.10 mg L ⁻¹)	82.0 ± 2.00	14.6 ± 1.48	1.38 ± 0.50	2.00 ± 0.53	1.00 ± 0.42
Al (0.20 mg L ⁻¹)	67.5 ± 1.40	24.5 ± 1.05	2.00 ± 0.53	2.25 ± 0.70	3.25 ± 0.65
Al (0.30 mg L ⁻¹)	63.8 ± 1.71	22.9 ± 1.13	2.75 ± 0.37	4.13 ± 0.67	5.50 ± 1.30
Zn (0.18 mg L ⁻¹)	74.0 ± 1.46	21.3 ± 1.41	2.50 ± 0.82	2.00 ± 0.85	0.25 ± 0.25
Zn (0.27 mg L ⁻¹)	71.9 ± 4.49	13.8 ± 2.09	3.50 ± 0.50	2.25 ± 0.88	8.50 ± 1.92
Zn (0.35 mg L ⁻¹)	60.6 ± 3.38	23.6 ± 2.03	1.88 ± 0.48	3.25 ± 0.53	5.88 ± 1.04

CAPÍTULO II

RODOVIAS AUMENTAM A CONCENTRAÇÃO METAIS NAS ÁGUAS EM SEU ENTORNO? UM ESTUDO DE CASO NO SUL DO BRASIL.

Vagner José de Albuquerque¹, Marília Hartmann¹, Paulo Afonso Hartmann¹

¹Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, ERS 135 - Km 72, 200, Cx Postal 764, CEP 99700-970, Erechim, RS, Brasil.

Resumo: As rodovias são fontes geradoras de poluentes que podem afetar os ambientes aquáticos e, por consequência, a saúde de organismos que dependem da água para sobreviver e reproduzir. Dentre as substâncias com potencial poluidor encontram-se os elementos metálicos. Ao exceder a capacidade de carga do ambiente os elementos metálicos tornam-se fonte de poluição ambiental, apresentando-se como substâncias com propriedades prejudiciais e bioacumulativas. Este estudo teve o objetivo analisar o efeito da presença das rodovias na ocorrência de elementos metálicos na água. O estudo foi realizado as no entorno da rodovia RS-135, entre os municípios de Sertão e Erechim no norte do Estado do Rio Grande do Sul. As coletas de água foram realizadas em três ambientes com diferentes tipos de influência do escoamento de águas superficiais: a) no entorno da rodovia ERS-135 (RODO 1 a ROD 6); b) corpos hídricos em sistemas agrícolas no entorno da ERS-135 (AGRO 1 a AGRO 3); e c) corpos hídricos no interior do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS 1 a PNMS 3). Em cada ponto foram coletadas duas amostras de água, a primeira no mês de outubro e a segunda no mês de dezembro de 2022. A estimativa da presença e da concentração de elementos metálicos foi realizada por meio de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). Foi avaliada a presença e concentração dos seguintes elementos: Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, Zn. O Ca, Mg e Na mostraram diferenças significativas, com concentração maior no entorno da rodovia, quando comparados com amostras sem influência da rodovia. Ainda, os pontos amostrais no entorno da rodovia tiveram maiores concentrações de metais comparados ao controle (área agrícola e PNMS). Desta forma foi possível verificar que a rodovia contribuiu de forma significativa para a presença de metais nos corpos hídricos próximos.

Palavras-Chave: ecologia de estradas, elementos metálicos, águas superficiais, contaminação.

DO ROADS INCREASE THE CONCENTRATION OF METALS IN THE WATERS AROUND THEM? A CASE STUDY IN SOUTHERN BRAZIL

Vagner José de Albuquerque¹, Marília Hartmann^{1*}, Paulo Afonso Hartmann¹

¹Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, ERS 135 - Km 72, 200, Cx Postal 764, CEP 99700-970, Erechim, RS, Brasil.

Abstract: Highways are sources of pollutants that can affect aquatic environments and, consequently, the health of organisms that depend on water to survive and reproduce. Among the substances with polluting potential are metallic elements. By exceeding the carrying capacity of the environment, metallic elements become a source of environmental pollution, presenting themselves as substances with harmful and bioaccumulative properties. This study aimed to analyze the effect of the presence of highways on the occurrence of metallic elements in water. The study was carried out around the RS-135 highway, between the municipalities of Sertão and Erechim in the north of the State of Rio Grande do Sul. Water collections were carried out in three environments with different types of influence from surface water runoff: a) around the ERS-135 highway (RODO 1 to ROD 6); b) water bodies in agricultural systems around ERS-135 (AGRO 1 to AGRO 3); and c) water bodies within the Sertão Municipal Natural Park (PNMS 1 to PNMS 3). At each point, two water samples were collected, the first in October and the second in December 2022. The estimation of the presence and concentration of metallic elements was carried out using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). The presence and concentration of the following elements was evaluated: Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, Zn. Ca, Mg and Na showed significant differences, with higher concentrations around the highway, when compared to samples without the influence of the highway. Furthermore, the sampling points around the highway had higher concentrations of metals compared to the control (agricultural area and PNMS). In this way, it was possible to verify that the highway contributed significantly to the presence of metals in nearby water bodies.

Key words: road ecology, metallic elements, surface waters, contamination.

INTRODUÇÃO

A construção e operação de rodovias é uma das formas mais comuns de modificação da paisagem e sua implantação gera vários impactos ambientais, como a fragmentação da paisagem (LAURENCE, 2019; OLIVEIRA et al., 2020), mortalidade por atropelamentos (CAVALLET et al., 2023; PESSANHA et al., 2023), e poluição (ANWAR et al.; 2020; XU et al., 2021). Estes impactos são mais evidentes no entorno das rodovias, onde a qualidade do habitat é reduzida, o que pode afetar a dinâmica das populações (LAURANCE et al., 2009; HARTMANN et al., 2011).

Embora os principais estudos de ecologia de estradas estejam voltados aos ambientes terrestres, algumas pesquisas vêm se dedicando a elucidar aos impactos gerados pelas rodovias nos ambientes aquáticos (AZEVEDO-SANTOS et al., 2022). Esses ambientes podem ser afetados pela criação de barreiras físicas e pelo aumento de zonas de alagamento (BREJÃO et al., 2020), ou por agentes potencialmente poluentes, oriundos de vazamento por veículos transporte ou acúmulo de resíduo devido ao tráfego rodovias (GALVAN et al., 2019).

As rodovias, principalmente as intensamente trafegadas, são importantes fontes de poluentes no ambiente em seu entorno. Rodovias com alto volume de tráfego mostram aumento das taxas de poluição, causando uma contaminação do ar e dos mananciais hídricos no entorno rodovias (BELUTA; COELHO, 2020). Além de resíduos gerados pela estrutura das rodovias intenso tráfego de veículos promove descarte irregular de lixo, lançamento de particulados automotivos, emissão e acúmulo de gases poluentes, como monóxido de carbono e hidrocarbonetos, além da poluição sonora que pode causar estresse e perturbação na fauna local (RODRIGUES, 2010). Quanto maior o tempo de existência da rodovia maior tende a ser seu impacto nos ecossistemas marginais (VIEIRA, 2012).

Os poluentes encontrados em rodovias com potencial para atingir os corpos hídricos originam-se de uma variedade de fontes, incluindo combustão incompleta e completa de combustível, perdas de combustível e vazamento de óleo de sistemas hidráulicos, corrosão e o desgaste de componentes de veículos, como por exemplo, pneus, freios, embreagem e motor (GALVAN; MIQUELUTTI, 2019). No conjunto, estes potenciais poluentes promovem

alterações nos sistemas terrestres e aquáticos, interferindo na abundância das espécies e nos processos ecológicos (SILVA, 2016).

Elementos metálicos podem ser liberados na ocorrência de alterações das características físico e químicas das rodovias e atingir os corpos d'água, sendo então transferidos para os organismos que habitam os ecossistemas no entorno (BELUTA; COELHO, 2020). A utilização da água para a manutenção das culturas agrícolas através irrigação propicia a contaminação da biota aquática e, conseqüentemente, do próprio ser humano (BAIRD; CANN, 2011).

Os metais são resíduos não degradáveis e podem persistir no ambiente por muito tempo, podendo ser adsorvidos em partículas dos sedimentos, precipitar como sulfatos, óxidos e carbonatos, ou co-precipitar com oxido de ferro ou manganês ligando-se a matéria orgânica (DE SOUZA et al., 2020). Embora alguns elementos sejam considerados fundamentais às atividades biológicas de organismos aquáticos, como o zinco (Zn), o cobre (Cu), o boro (B), o selênio (Se), o cobalto (Co) e manganês (Mn), quando ultrapassam o limite de tolerância desses indivíduos podem ser incompatíveis com a vida (SANTANA, 2018).

Outros elementos, no entanto, podem ter efeitos deletérios mesmo em baixas concentrações, como por exemplo o alumínio (Al), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg), considerados altamente tóxicos, requerendo intensivo controle e monitoramento (MARTINS et al., 2011; JING; KJELLERUP, 2017; AGUILAR et al., 2020). Assim, ao exceder a a capacidade de carga do ambiente os elementos traço tornam-se fonte de poluição ambiental, apresentando-se como elementos de propriedades prejudiciais e bioacumulativas (MARCHI et al., 2009).

Os metais que estão presentes no ambiente aquático são originados de fontes naturais e antropogênicas. O intemperismo geológico aliado a geração de resíduos industriais, urbanos e agrícolas, faz com que esses elementos sejam depositados principalmente no sedimento, seguidos pela dissolução na água, podendo contaminar a biota residente (DE ALMEIDA et al., 2022). A presença de elementos traço no ambiente é altamente persistente (REZENDE, 2009). Embora esses elementos se depositem de modo significativo no solo (KHAN et al,

2011), a lixiviação tende a conduzi-los até os corpos de água superficiais, podendo ser uma fonte geradora de poluição aquática (MACIEL, 2017).

Os efeitos dos elementos metálicos nos ecossistemas aquáticos contribuem para a redução nos níveis de crescimento das populações, baixos índices de sucesso reprodutivo e o aumento da mortalidade por contaminação metálica. Portanto, a proteção e a manutenção da qualidade da água no entorno das rodovias são a base do gerenciamento de águas no seu entorno (BELUTTA et al., 2020).

Entender como potenciais contaminantes ambientais oriundos de rodovias podem alcançar corpos hídricos, e em quais concentrações, pode colaborar no estabelecimento de estratégias de mitigação dos impactos de rodovias em seu entorno. Neste estudo avaliamos a ocorrência de elementos metálicos em corpos hídricos com e sem a influência da rodovia e procuramos responder as seguintes questões: 1) Quais os principais elementos metálicos ocorrentes em corpos hídricos com e sem a influência da rodovia? 2) As concentrações de elementos metálicos em corpos hídricos variam em função da proximidade da rodovia? Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar se rodovias podem promover aumento da concentração de elementos metálicos nas águas em seu entorno.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

A coleta de água foi realizada no trecho da rodovia ERS-135, entre os municípios de Sertão (-27° 97' 276" W, 52° 25' 158"S) e Erechim (- 27° 73' 249" W, 52° 28' 191" W), no norte do Estado do Rio Grande do Sul. Estruturalmente a rodovia é de pistas simples e pavimentada, com acostamentos de cerca de 2,0 m e limite de velocidade entre 80 e 100 km/h.

O tráfego na estrada é alto, com média de 4.853 veículos/dia sendo 1.340 de veículos de carga (EGR, 2023).

A rodovia é administrada pela Empresa Gaúcha de Rodovias (EGR) sendo responsável pela gestão ambiental realizada através do Projeto Básico de Gestão ambiental (PBA) que atende as diretrizes da FEPAM. O PBA contempla o Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos e Efluentes (PGRSEL) que estabelecem medidas, ações e atividades a serem desenvolvidas nas ações cotidianas na tentativa de reduzir os riscos associados a poluentes na rodovia.

A região do estudo caracteriza-se pelo clima subtropical úmido, com suave variação orológica que oscilam entre 687 e 783 m sob o nível do mar. A amplitude térmica encontra-se na faixa de variação de temperatura média entre 13,2°C (mínimas) e 22°C (máximas) durante os meses. As chuvas são bem distribuídas, com média de 1.787,8mm por ano e umidade relativa do ar média de 72% (DECONTO, 2019).

Coleta e análise de água

As análises de metais presentes na água foram realizadas em três ambientes com diferentes tipos de influência do escoamento de águas superficiais: a) no entorno da rodovia ERS-135; b) corpos hídricos em sistemas agrícolas no entorno da ERS-135; e c) corpos hídricos no interior do Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS; Figura 1).

Nos corpos hídricos no entorno da rodovia ERS-135 foram selecionados seis pontos amostrais (RODO 1, 2, 3, 4, 5 e 6), localizados entre 5 e 15 metros das da rodovia, caracterizados como corpos hídricos lênticos com recebimento de água via escoamento superficial proveniente da rodovia, mas também dos sistemas agrícolas no entorno. Nos corpos hídricos em sistemas agrícolas no entorno da ERS-135 foram selecionados três corpos hídricos lênticos (AGRO 1, 2 e 3), distantes entre 500 e 1500 metros da rodovia, sem influência do escoamento de água da rodovia, porém com recebimento de água via escoamento superficial dos sistemas agrícolas. Nos corpos hídricos no interior do Parque

Natural Municipal de Sertão (PNMS) foram selecionados três corpos hídricos lânticos ou lóticos (PNMS 1, 2 e 3), distantes entre 2000 e 3000 metros da rodovia, sem influência do escoamento de água da rodovia, nem dos sistemas agrícolas no entorno.

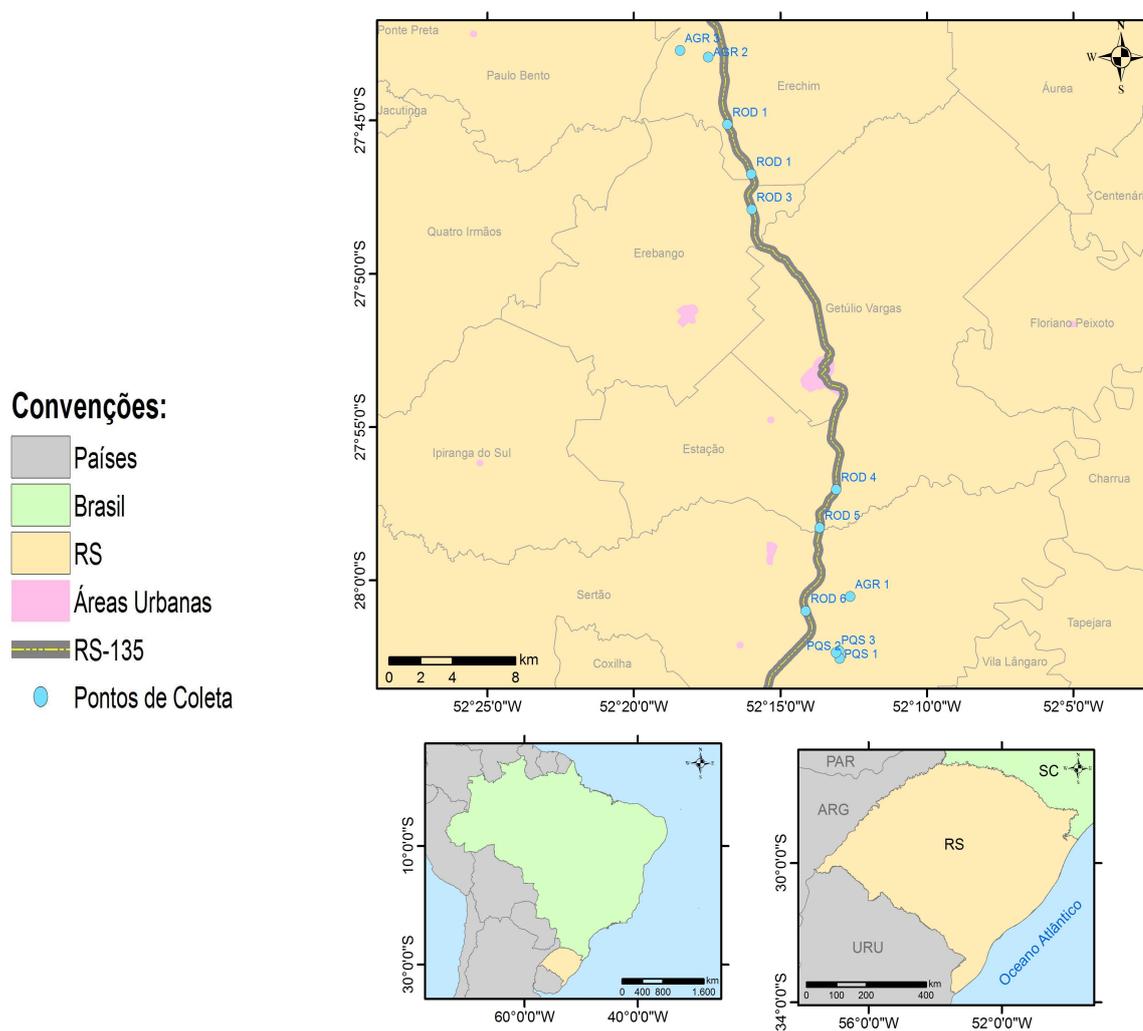


Figura 1. Mapa de localização pontos de amostragem de água. Sist. Referência: SIRGAS 2000. Sistema de coordenadas: Geográficas. Laboratório de Geoprocessamento. Junho/2023. Pontos amostrais: Rodovia (RODO1 - 6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 - PNMS3).

Foram coletadas amostras de água em dois períodos (outubro e dezembro de 2022). As amostras foram acondicionadas em tubos de falcon de 50 ml e encaminhadas a central analítica da Universidade Federal da fronteira Sul, Campus Erechim. As águas foram analisadas pelo método espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, ICP) com chama física de argônio. ICP-OES utilizado é da marca Shimadzu modelo ICPE-9820.

Foram analisadas as concentrações de 13 metais: Alumínio (Al), Arsênio (As), Cálcio (Ca), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) e todas as leituras foram feitas na axial, que possibilita uma leitura que resulta na maior sensibilidade do equipamento e melhores condições operacionais (Tabela 1).

A calibração foi feita utilizando padrões multielementar preparados em ácido nítrico 5%. Os pontos das curvas de calibração utilizados foram: 0, 10, 25, 50, 70, 100, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o preparo da curva de calibração e diluição das amostras foi utilizado água ultrapurificada em sistema milli-q. Ácido nítrico P.A (Sigma Aldrich) diluído em água ultrapura foi utilizado para o preparo da curva de calibração. A curva de calibração foi preparada utilizando um padrão multielementar de 10 mg L^{-1} (Specsol). O limite do comprimento foi ajustado para cada elemento (Tabela 1).

Tabela 1. Comprimento de onda por metal testado por espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido ICP-OES

ANALÍTOS	Comprimento de Onda (nm)
Al	167,081 (II)
As	228,812 (I)
Ca	317,933 (II)
Cd	214,438 (II)
Cr	205,552 (II)
Cu	213,598 (II)
Fe	235,204 (II)
K	766,490 (I)
Mg	383,826 (i)
Mn	257,610 (II)
Na	330,232 ((I)

Pb	220,353 (II)
Zn	202,548 (II)

Procedeu-se então, para cada elemento, ao traçado do espectro de uma solução contendo apenas a espécie química a ser determinada, a fim de identificar e ajustar o pico de emissão do elemento. Posteriormente, fez-se a leitura do branco, de uma amostra e do ponto máximo da curva de calibração, sendo o primeiro ponto da curva o valor de $5\mu\text{g L}^{-1}$.

Análises Estatística

Os dados obtidos foram analisados previamente para a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Após confirmação da distribuição normal e homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 9.5.1. As concentrações registradas foram comparadas os limites determinados pela legislação vigente (BRASIL, 2005) como ambientalmente seguro para águas lânticas do tipo II.

Foi utilizado também análise de correlação linear r (Pearson). Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) foi usada com o objetivo de verificar as semelhanças entre os pontos e as amostras de água no entorno da rodovia. Os dados foram previamente padronizados para evitar erros de classificação devido à diferença de dimensão dos dados (UPGA) (DAWYNDT et al., 2006). As análises foram realizadas no programa Past 4.0 e a partir de HCA dendrogramas foram gerados.

RESULTADOS

Dos treze elementos investigados, oito elementos metálicos foram detectados nas águas analisadas: Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn. Os elementos As, Cd, Cu, Cr e Pb estavam

abaixo do limite de detecção (LOD) do ICP- OES. Os elementos Ca, K, Mg e Na foram amplamente encontrados nos pontos amostrais, sendo registrados em praticamente todas as amostras. Das 16 coletas de água realizadas, apenas três não identificaram elementos acima do ponto de detecção, o Al e Mn no ponto C1 e o Zn no ponto C2.

As maiores concentrações dos elementos foram observadas em algum ponto no entorno da rodovia, exceto para Mn e K, onde as maiores concentrações foram registradas nos pontos C1 e C2 da área agrícola, respectivamente (Tabela 3). Sete elementos metálicos mostraram as maiores concentrações nos pontos no entorno da rodovia, quando consideramos as duas coletas de água (Tabela 3)

Tabela 2. Concentração de elementos metálicos na água ($\mu\text{g L}^{-1}$) de acordo com o local de coleta. <LOD = <5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Alumínio (Al), Cálcio (Ca) Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn). Pontos amostrais: Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 - PNMS3). C1 – Coleta 1 (outubro 2022), C2 – Coleta 2 (dezembro 2022). Em negrito as maiores concentrações registradas por elemento, por coleta de água.

METAL/ PONTO	Al		Ca		Fe		K		Mg		Mn		Na		Zn	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
RODO1	<LOD	<LOD	818	983	<LOD	83,4	39,2	<LOD	3300	3970	<LOD	<LOD	212	287	<LOD	<LOD
RODO2	<LOD	406	704	941	8,82	515	46,9	119	2990	4410	<LOD	20	174	237	<LOD	<LOD
RODO3	<LOD	7790	579	1090	<LOD	9,51	42,8	85,1	3100	4510	<LOD	24	194	295	<LOD	<LOD
RODO4	<LOD	122	920	<LOD	943	<LOD	42,6	125	9170	<LOD	<LOD	<LOD	192	<LOD	<LOD	<LOD
RODO5	<LOD	<LOD	1560	1160	<LOD	2,07	30,3	62,3	3505	3846	<LOD	<LOD	250	389	<LOD	<LOD
RODO6	<LOD	69,4	679	769	378	10,7	64,9	68,3	3470	3970	<LOD	<LOD	118	124	59,8	<LOD
AGRO1	<LOD	<LOD	609	499	<LOD	12,7	32,9	104	1170	2630	<LOD	<LOD	200	157	<LOD	<LOD
AGRO2	<LOD	<LOD	226	241	<LOD	35,6	44,1	38,3	3200	1340	<LOD	<LOD	45,9	35,7	<LOD	<LOD
AGRO3	<LOD	<LOD	776	370	<LOD	14,3	72,5	109	1720	1980	<LOD	426	179	222	24,1	<LOD
PNMS1	<LOD	<LOD	376	494	<LOD	<LOD	27,8	59,1	2110	2870	<LOD	<LOD	93,4	107	<LOD	<LOD
PNMS2	<LOD	<LOD	660	537	8,82	34	106	59,8	2870	3100	<LOD	<LOD	94,7	129	<LOD	<LOD
PNMS3	<LOD	200	597	672	<LOD	30,6	56,9	52,7	3450	3950	<LOD	<LOD	19	157	<LOD	<LOD

Dentre os oito elementos metálicos encontrados, Ca, Mg e Na mostram diferença significativa nas concentrações entre as áreas amostradas (Tabela 4). Houve maior concentração de Ca no entorno das rodovias que nas áreas agrícolas e no PNMS. O Mg mostrou maior concentração no entorno da rodovia que na área agrícola. O Na mostrou maior concentração no entorno da rodovia que no PNMS. Para os demais elementos metálicos não houve diferença significativa entre as áreas (Tabela 4).

Tabela 3. Diferenças estatísticas entre os pontos amostrados. Metais Alumínio (Al), Calcio (Ca) Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn). Pontos amostrais: Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 – PNMS3). Três ambientes (ANOVA), RODOxAGRO, RODOxPNMS AGROxPNMS (Tukey)

Elemento	Três ambientes	RODO x AGRO	RODO x PNMS	AGRO x PNMS
Al	F = 0,53; p = 0,59	-	-	-
Ca	F = 10,06; p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05	-
Fe	F = 1,42; p = 0,21	-	-	-
K	F = 0,08; p = 0,92	-	-	-
Mg	F = 5,60; p = 0,01	p < 0,05	-	-
Mn	F = 3,66; p = 0,25	-	-	-
Na	F = 6,42; p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05	-
Zn	F = 0,28; p = 0,75	-	-	-

O Al, o Fe e o Mn foram detectados com concentração superior ao limite determinado pelo CONAMA (BRASIL, 2005) como ambientalmente seguro para águas lênticas do tipo II (Tabela 5), sendo o Al (RODO3) e o Fe (RODO4) em pontos no entorno da rodovia e o Mn em ponto na área agrícola (AGRO3).

Tabela 4. Comparação entre valores máximos para cada elemento metálico detectado nas análises de água (mg L⁻¹) com a padronização da norma Brasileira para água do Tipo II (mg/L-1). NP – metal não padronizado. Em negrito as maiores concentrações registradas por elemento.

Elemento	Al	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Maior concentração	7,79	1,56	0,94	0,12	9,17	0,43	0,39	0,06
CONAMA (BRASIL, 2005)	0,1	NP	0,3	NP	NP	0,1	NP	0,18

Houve correlações positivas com valor de r2 0,500 entre os metais, destacando-se a correlação entre Ca - Na, Fe - Mg e Ca - Mg. Observa-se também algumas correlações negativas entre alguns resultados obtidos (Figura 2).

Os resultados das análises do HCP revelam mais detalhadamente as similaridades entre os pontos de coleta. Houve um agrupamento com cinco dos seis pontos amostrais no entorno da rodovia (exceto RODO4), mais um ponto do Parque (PNMS3). Outro agrupamento foi formado com os pontos da área agrícola e dois dos pontos do Parque (exceto PNMS3). O ponto RODO4 separado dos dois outros agrupamentos (Figura 3).

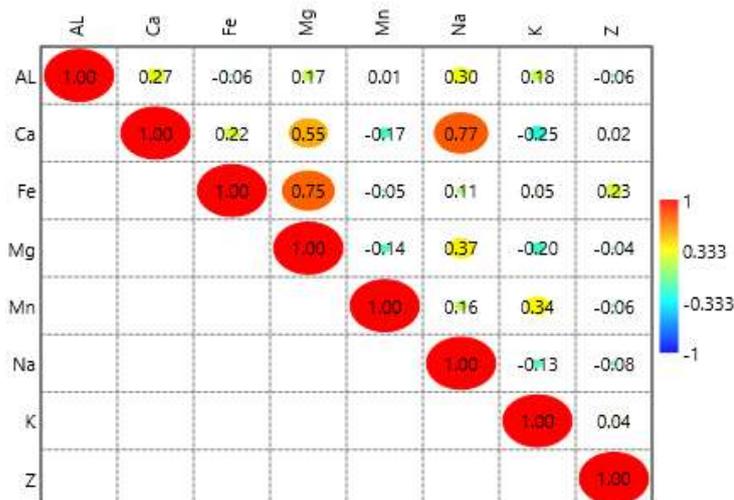


Figura 2. Matriz de correlação lineares de dados obtidos das concentrações de elementos metálicos contidos nas amostras de água

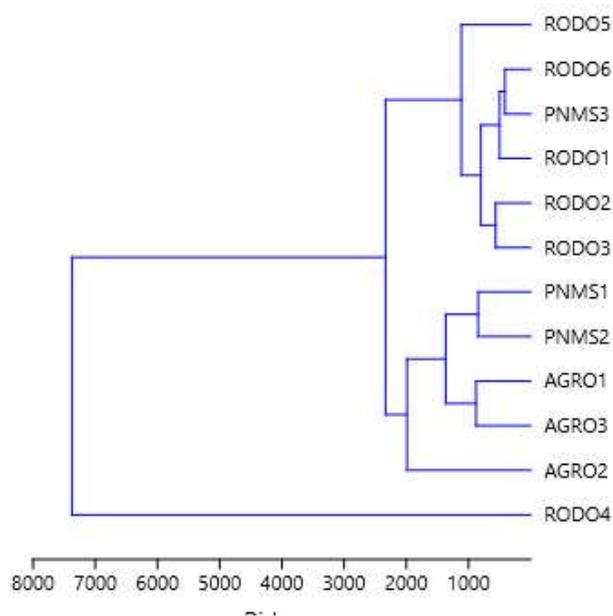


Figura 3. Dendrograma das concentrações de metais registrados nos pontos de amostrais. Rodovia (RODO1 - RODO6), Área agrícola (AGRO1 - AGRO3), Parque Natural Municipal de Sertão (PNMS1 - PNMS3)

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados indicam forte protagonismo dos íons de Ca, K, Mg e Na na composição das águas estudadas. Esse comportamento é esperado visto que os sistemas aquáticos naturais são abertos e dinâmicos e por isso sofrem modificações contínuas na sua composição hidrogequímica (COSTA et al., 2008), sendo esses elementos são os constituintes iônicos principais da água (PARRA, 2006). A litologia local pode ser

considerada como a principal fonte destes elementos para as águas superficiais, sendo a geoquímica um reflexo dos minerais presentes nas rochas (SILVA, 2005). Apesar dos elementos Al, Fe, Mn e Zn, apresentarem baixas expressões na maior parte das amostras, estes são de extrema importância em sistemas aquáticos, pois são considerados tóxicos a biota, podendo também ser utilizados para medir o impacto de atividades antrópicas (BENTO et al., 2020; MOSCHEM; GONÇALVES, 2020).

Os resultados encontrados indicam que a proximidade da rodovia teve influência na concentração de metais da água em seu entorno. Os pontos no entorno da rodovia apresentaram as maiores concentrações absolutas para sete dos oito elementos e para três elementos houve diferença significativa entre as concentrações no entorno da rodovia e as áreas agrícolas ou do PNMS (Ca, Mg, Na). As concentrações de metais nas águas são controladas por processos que regem o transporte e deposição dos sedimentos (MARX; KAMBER, 2014). Estes processos podem ocorrer por caminhos naturais, como intemperismo de rochas e consequente escoamento pelo solo até os corpos hídricos, ou como decorrência de ações antrópicas. As maiores concentrações de íons nas águas próximas as rodovias parecem ser causadas por fontes antrópicas, oriundas de material particulado liberado e disperso pelo tráfego de veículos na rodovia que chegam aos corpos d'água, que se tornam solúveis e permanecem suspensos (HUNG-LUNG; YAO-SHENG, 2009; CHOI et al, 2020; VLASOV et al., 2020).

As chuvas sobre as rodovias e por consequência o escoamento da água para os mananciais hídricos, são fontes de poluição por elementos metálicos no entorno. Este transporte pode ser o principal responsável pela maior concentração de Ca, Mg e Na no entorno da rodovia, quando comparado com as outras áreas. Anualmente, em climas temperados e frios, o transporte de quantidades significativas de sais oriundos da rodovia é fruto desse processo (KUPKA et al., 2022).

As principais fontes de Ca e Mg nas margens da rodovia podem ter origem da poeira de elementos estruturais de cimento de construção e seus derivados (SKORBIŁOWICZ; SKORBIŁOWICZ, 2019), bem como a qualidade do cascalho utilizado (AL BARGI et al., 2020). Contudo, concentração dos os quatro elementos principais (Ca, Mg, Na, K) do entorno das rodovias são influenciados também pelo uso e desgaste do pavimento, pela movimentação

veicular e pela combustão de combustível fosseis, provenientes do desgaste dos travões, pneus, pavimentos rodoviários. Estas fontes podem representar até 90 % dos elementos particulados presentes as margens das rodovias (PRICITELLO et al., 2020).

Nas áreas agrícolas, as atividades de plantio e uso de fertilizantes, muitas vezes realizadas próximas de fontes de água são a principal fonte antropogênica de contaminação por metal (SHI et al, 2019). O uso de fertilizantes e agrotóxicos, bem como seu manejo inadequado, pode afetar as águas superficiais (KARAOUS et al., 2021). Além do mais, essas áreas sofrem também com a poluição sedimentar ocorre devido ao mal uso do solo, com a erosão, com desmatamento, criação de animais (NUNES; RHODEN, 2020). Neste estudo as maiores concentrações K e Mn foram nas áreas agrícolas e podem estar associadas ao manjo destas áreas.

O Mg, além de diferir em concentração entre o entorno da rodovia e a área agrícola, foi relevante em termos de presença em praticamente todos os pontos amostrais. Por sua vez, não existem restrições imediatas quanto à concentração de Mg no ambiente, contudo, alguns organismos podem sofrer com a deficiência de Ca, quando a proporção de $Mg/[Ca+Mg]$ na água for a 50-65% (FRANKLIN et al., 2008). Desta forma, a correlação entre o Ca e Mg, demonstrado nesse estudo, pode ser caracterizada como ambientalmente perigoso.

Além disso, Ca e Mg são íons relacionados a dureza da água, quanto maior a concentração de Ca e Mg diluído em água, maior é a sua dureza. A dureza diminui a capacidade da água em reter oxigênio, entretanto aumenta a condutividade, alcalinidade e o pH, além de gerar aumento de nitrato e de fosfato (MATOS, 2020). A correlação entre o Ca e Na pode indicar a ocorrência de processos de dissolução de carbonatos ou à troca catiônica com entre Ca e Na. Assim a solubilidade do Ca tende a aumentar em presença de sais de sódio e K (PATRICIO et al., 2018).

Os dados da análise de agrupamento mostraram que os pontos da rodovia formaram grupos distintos dos pontos das áreas agrícolas e do Parque. O único ponto agrupado com os pontos da rodovia foi o PNMS3, possivelmente pelos valores altos de Ca, K, Mg e Na. Estas concentrações altas indicam altos índices de ciclagem de nutrientes, sendo uma reserva mineral importante. Contudo, ao apresentar similaridade com os pontos da rodovia, e sobretudo pela presença do Al, representa um alerta sobre a qualidade ambiental da água desta

Unidade de Conservação. Essa área de preservação sofre grande pressão do entorno, pois é cercada por área de cultivo agrícola, e, em seu interior, já foi relatado a presença de 11 tipos de agrotóxicos, como o Imazatap D-24, além de outras alterações ambientais no nível de Nitrogênio (N) e fósforo (P) correlacionados a problemas ambientais de fauna (BAGNOLO, 2022).

As concentrações de Al, Fe e Mn foram superiores ao limite determinado pela legislação brasileira (BRASIL, 2005) em alguns pontos amostrais. O Al, que embora apareça em poucos pontos amostrais, atingiu concentrações ambientalmente altas no ponto RODO3. A mobilização de Al em formas solúveis nos ecossistemas aquáticos é um fator importante de acidificação da água, o que ser prejudicial a vida nos ecossistemas (RANDON-BARRAGAN et al., 2007). Esse metal ultrapassou os níveis permitidos para as águas Classe I e II, caracterizando um problema ambiental nas áreas no entorno da rodovia (BRASIL, 2005).

Na natureza, ferro e o manganês são encontrados quase sempre juntos. Estão em todos os tipos de corpos de água (RIBEIRO; SANTOS; SALES, 2019). O excesso de ferro na água é considerado um problema ambiental e de saúde pública e está relacionado ao mau cheiro, a proliferação de bactérias ferruginosas nocivas, e alteração da cor. As condições ideais para o surgimento de ferro nas águas superficiais parecem estar basicamente associadas a regiões tropicais úmidas com relevo suave (PINTO et al., 2023) e intensa alteração química favorecidas pela presença de poeira oriunda das rodovias (SKORBIŁOWICZ; SKORBIŁOWICZ, 2019).

O Mn, assim como o Fe, ao entrar em contato com oxigênio, oxida e confere cor e turbidez para a água (SOUZA-SILVA et al., 2023). No ecossistema aquático, o Mn pode interagir com os seres vivos formando complexos com os grupos funcionais das enzimas, alterando ou impedindo o transporte de substâncias essenciais (TUZUKI et al., 2017). Nos animais o Mn pode causar alterações neurológicas, genotóxicas e alterações comportamentais (GNOCHI, 2023).

As concentrações de sete dos metais analisados tendem a ser maior, mesmo que pontualmente, nas águas no entorno da rodovia. No caso de Al, Fe e Mn, as concentrações ultrapassaram os limites previstos na norma Brasileira para água do Tipo II (BRASIL, 2005). Três metais (Ca, Mg e Na) mostraram diferenças significativas, com concentração maior no

entorno da rodovia, quando comparados com as outras amostrais sem influência da rodovia. Além disto, os pontos amostrais no entorno da rodovia foram claramente agrupados e separados dos outros pontos nas áreas agrícolas e do Parque, o que reforça a influência da rodovia nas águas no seu entorno.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados desta pesquisa concluímos que o uso e a operação da rodovia favorecem o aumento da concentração de metais dissolvidos nas águas superficiais, com potencial de poluir as águas do seu entorno. A longo prazo a contaminação das águas superficiais ao redor das rodovias podem se tornar um problema ambiental grave e comprometer a vida vegetal e animal circundante. Recomenda-se que sejam realizados estudos em outras rodovias, com diferentes volumes de tráfego, em outras regiões, e com diferentes sazonalidades, a fim de aprofundar o conhecimento e verificar se os padrões encontrados nesse estudo se repetem.

REFERÊNCIAS

AL BARGI, W. A.; KHALIFA, N. A.; DANIEL, B. D.; ROHANI, M. M.; ODEBIYI, O. S. An Experimental Investigation on the Effect of Calcium Chloride As Dust Suppressant on the Strength of Unpaved Road. **International Journal of Sustainable Construction Engineering and Technology**, v. 14, n. 2, p. 121–130. 2023. doi.org/10.30880/ijscet.2023.14.02.013.

AGUILAR, C. N.; SOARES, L. Q.; MENDES, F. Q.; DE CARVALHO, A. M. X.; NASSER, V. G. Avaliação do teor de metais pesados na água de Rio Paranaíba–MG. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 64871-64880.2020. doi:10.34117/bjdv6n9-064.

ANWAR, S.; NAZ, A.; ASHRAF, M. Y.; MALIK, A. Evaluation of inorganic contaminants emitted from automobiles and dynamics in soil, dust, and vegetations from major highways in Pakistan. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 32494-32508. 2020. doi.org/10.1007/s11356-020-09198-x

AZEVEDO-SANTOS, V. M.; DAGA, V. S.; FEARNESIDE, P. M. Roads To Pollution: Brazil's Aquatic Biodiversity Affected By Truck Leaks. **Oecologia Australis**, v. 26, n. 3, p. 483-493. 2022. doi.org/10.4257/oeco.2022.2603.07

BAGNOLO, C. E. M. **Conservação de anfíbios de riachos do Parque Natural Municipal de Sertão, RS**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Fronteira Sul. 2022.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 4.ed., 2011. 844p.

BELLUTA, I.; COELHO, J. C.; DE JESUS, S. A.; DE CARVALHO, L. R.; WONDRACEK, M. H. P.; DE CASTRO, G. R.; DOYAMA, J. T Stormwater runoff de rodovias e áreas urbanas: Fonte principal de contaminação por metais no córrego da cascata–botucatu (sp). **Geosciences**, v. 39, n. 2, p.543-558. 2020.

BENTO, C. C.; LIMA, G. F. C.; BAGGIO, H.; HORN, A. H. Avaliação De Qualidade Das Águas Superficiais No Lago Da Barragem De Três Marias-Mg. **Geochimica Brasiliensis**, v. 33, n. 4, p. 341–357. 2020. doi.org/10.21715/GB2358-2812.2019334341.

BONKE, E.; ZWICKER, K.; DRÖSE, S. Manganese ions induce H₂O₂ generation at the ubiquinone binding site of mitochondrial complex II. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 580, p.75–83. 2015. doi:10.1016/j.abb.2015.06.011.

BRASIL. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 357**, DE 17 DE março DE 2005. Disponível em http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf.

BREJÃO, G. L.; TERESA, F. B.; GERHARD, P. When roads cross streams: fish assemblage responses to fluvial fragmentation in lowland Amazonian streams. **Neotropical Ichthyology**, v. 18. 2020 doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0031.

CAVALLET, I. C. R.; DIELE-VIEGAS, L. M.; MARIOTTO, P. B.; LANGE, R. R. Padrões de atropelamentos de vertebrados na região sul da Mata Atlântica, litoral do Paraná–Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83. 2023. doi.org/10.1590/1519-6984.263311.

CHOI, J.-Y.; JEONG, H.; CHOI, K.; GI HOON HONG; DONG HYUN YANG; KIM, K.-T.; RA, K. Source identification and implications of heavy metals in urban roads for the coastal pollution in a beach town, Busan, Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 161, p. 111724–111724. 2020.

DAWYNDT, P.; DE MEYER, H., DE BAETS, B. UPGMA clustering revisited: A weight-driven approach to transitive approximation. **International Journal of Approximate Reasoning**, v. 42, n. 3, p. 174–191. 2006. doi.org/10.1016/j.ijar.2005.11.001.

DE ALMEIDA, P. R., FERRARI, R. G., KATO, L. S., HAUSER-DAVIS R. A., CONTE-JUNIOR, C. A. A systematic review on metal dynamics and marine toxicity risk assessment using crustaceans as bioindicators. **Biological Trace Element Research**, v. 200, n. 2, p. 881–903. 2021. doi.org/10.1007/s12011-021-02685-3.

DECONTO, E. Qualidade da água superficial da sub-bacia hidrográfica do rio Abaúna, município de Erebangó, RS. **Ufrgs.br**, 2019. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/205544>>. Acesso em: 7 nov. 2023.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807. 2002. doi.org/10.1351/pac200274050793.

FRANKLIN, W. T.; OLSEN, J. S.; SOLTANPOUR, P. N. Effects of excessive magnesium in irrigation waters on wheat and corn growth. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 22, n. 1-2, p. 49–61. 1991.doi: 10.1080/00103629109368394.

GALVAN, N., S., M.L., MIQUELLUTI, D.J. SILVA, A. S. Influência do tráfego de veículos no teor de alumínio e metais pesados em infusão de macela (ACHYROCLINE SATUREIODES). **Nativa**, v. 7, n. 6, p. 702-707. 2019. doi.10.31413/nativa.v7i6.7746.

GNOCCHI, K. G. **Astyanax Lacustris (Teleostei: characidae) como bioindicador de efeitos relacionados à presença de manganês no ecossistema aquático.** Tese de Doutorado. Universidade de Vila Velha -ES. 2019.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; MARTINS, M. Snake Road Mortality in a Protected Area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 6, n. 1, p. 35–42. 2011. doi.10.2994/057.006.0105.

HUNG-LUNG, C.; YAO-SHENG, H. Particulate matter emissions from on-road vehicles in a freeway tunnel study. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 26, p. 4014–4022. 2009. doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.05.015.

JING, R.; KJELLERUP, B. V. Biogeochemical cycling of metals impacting by microbial mobilization and immobilization. **Journal of Environmental Sciences**, v. 66, p. 146–154. 2018. doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.035.

KHAN, M. N.; WASIM, A. A.; SARWAR, A.; RASHEED, M. F. Assessment of heavy metal toxicants in the roadside soil along the N-5, National Highway, Pakistan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 182, n. 1-4, p. 587–595. 2011. doi.org/10.1007/s10661-011-1899-8.

KUPKA, D.; KANIA, M.; PIETRZYKOWSKI, M.; ŁUKASIK, A.; GRUBA, P. Multiple Factors Influence the Accumulation of Heavy Metals (Cu, Pb, Ni, Zn) in Forest Soils in the Vicinity of Roadways. **Water Air and Soil Pollution**, v. 232, n. 5. 2021. doi.org/10.1007/s11270-021-05147-7.

LAURANCE, W. F. The thin green line: scientists must do more to limit the toll of burgeoning infrastructure on nature and society. **The Ecological Citizen**, v. 3, n 7. 2019.

LAURANCE, W. F.; GOOSEM, M.; LAURANCE, S. G. W. Impacts of roads and linear clearings on tropical forests. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 12, p. 659–669. 2009. doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.009.

GNOCCHI, K. G., BOLDRINI-FRANÇA, J., PASSOS, L. S., GOMES, A. S., COPPO, G. C., PEREIRA, T. M., CHIPPARI-GOMES, A. R. Multiple biomarkers response of *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) exposed to manganese and temperature increase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 100, p. 104124. 2023. doi.org/10.1016/j.etap.2023.104124.

MACIEL, B. L. O. **Contaminação dos solos marginais das rodovias no entorno da Estação Ecológica de Águas Emendas.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Gestão Ambiental). Universidade de Brasília. 2017.

MOSCHEM, J. da C.; GONÇALVES, P. R. Impacto Toxicológico de Metais Pesados: Uma Análise de Efeitos Bioquímicos e Celulares: Impact of Heavy Metals: An Analysis of Biochemical and Cellular Effects. **Health and Biosciences**, v. 1, n. 2, p. 88–100. 2020.

KAPEPA, M. Perfil de contaminação das águas e peixes por metais pesados e suas consequências para a saúde humana: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**, v. 1, n. 1, p. 16. 2020. doi.org/10.46675/rbcm.v1i1.1.

MARCHI, G.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A.; GONÇALVES, V. C. **Elementos traço e sua relação com qualidade e inocuidade de fertilizantes, corretivos agrícolas e resíduos orgânicos no Brasil**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 45p. 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2010/31582/1/doc-252.pdf>>.

MARTINS, C.A.S.; NOUEIRA, N. O.; RIBEIRO, P.H; RIGO, M.M., CANDIDO, A.O.A Dinamica de Metais-Traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.17, n.3-4, p.383-391. 2011.

MARX, S. K.; KAMBER, B. S. Trace-element systematics of sediments in the Murray–Darling Basin, Australia: Sediment provenance and palaeoclimate implications of fine scale chemical heterogeneity. **Applied Geochemistry**, v. 25, n. 8, p. 1221–1237. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2010.05.007>.

MATOS, C. R. **Níveis De Dureza Total Da Água, Pela Adição De Cloreto De Cálcio, No Cultivo De Juvenis De Tilápias Do Nilo**. Dissertação de Mestrado Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha e Mucuri. 2020.

NUNES, C. S.; RHODEN, A. C. Parâmetros De Qualidade Da Água Do Rio Quilombo Localizado Na Bacia Hidrográfica Do Rio Chapecó. **Anais de Agronomia**, v. 1, n. 1, p. 177–202. 2020.

OLIVEIRA, S. L., BASTOS, R. P., LACERDA, K. A. P., & ALVES, S. E. Ecologia de estradas: estado da arte no Brasil e no mundo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 98546–98573. 2020. doi:10.34117/bjdv6n12-371.

PATRICIO, B.; SILVA; LUIZ, L. Hydrochemical Investigation of Fluoride High Contents in Groundwaters in Portion of Guarani Aquifer System, Southern Brazil. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 41, n. 1, p. 52–65. 2018. doi.org/10.11137/2018_1_52_65.

PARRA, R. R. **Análise geoquímica de água e de sedimentos afetados por minerações na bacia hidrográfica do rio Conceição, Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais-Brasil**. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto.2006.

PINTO, Ana; PINTO, André; OLIVEIRA, Vincler. Qualidade das águas superficiais em pequenas bacias hidrográficas da Costa Leste do Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Pantaneira**, v. 22, p. 11-27. 2023.

PISCITELLO, A.; BIANCO, C.; CASASSO, A.; SETHI, R. Non-exhaust traffic emissions: Sources, characterization, and mitigation measures. **Science of The Total Environment**, v. 766, p. 144440. 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144440.

REZENDE, P.S. **Avaliação da Distribuição e Mobilidade de Elementos Traço em sedimentos da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco**. Dissertação de mestrado. UFMG. 2009.

RIBEIRO, A. A, DOS SANTOS, D.C. ,DA SILVA SALES, R. Análise da influência da intrusão salina em poços de abastecimento nas comunidades das Ilhas de São Caetano de Odivelas no nordeste paraense. **Editora Científica Digital eBooks**, p. 31-61. 2021. doi.10.37885/211006455.

RODRIGUES, N.M. **A estrada como elemento fragmentador de ecossistemas: Análise da estrutura da zona de amortecimento do Parque Nacional do Catimbau como contribuição ao estudo da ecologia de paisagem**. Tese de Doutorado. Universidade Federar de Pernambuco.2010.

SANTANA, J. D. J. **Avaliação da bioacumulação de metais tóxicos em ostras, em condições simuladas do descarte da água produzida no mar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2018.

SHI, T.; MA, J.; WU, X.; JU, T.; LIN, X.; ZHANG, Y.; LI, X.; GONG, Y.; HOU, H.; ZHAO, L.; WU, F. Inventories of heavy metal inputs and outputs to and from agricultural soils: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 118–124. 2018. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.016.

SILVA, M. L. D. S. **Biogeoquímica de elementos traço em solos de sistemas estuarinos: manguezais do estado de São Paulo (Brasil) e marismas da Galícia (Espanha)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2005.

SKORBIŁOWICZ, M.; SKORBIŁOWICZ, E. Content of Calcium, Magnesium, Sodium and Potassium in the Street Dust from the Area of Białystok (Poland). **Journal of Ecological Engineering**, v. 20, n. 10, p. 125–131. 2019. doi:10.12911/22998993/113145.

SOUZA-SILVA, G., DE SOUZA, C. R., PEREIRA, V. V., AZEVEDO, F. C. R., SOARES, I. V., ALCANTARA, M. D., SILVEIRA, M. R. Concentração De Íons Ferro E Manganês Solúveis Em Amostras De Água Bruta Para Consumo Humano Do Estado De Minas

Geraiis. Revista **Acta Ambiental Catarinense**, v. 20, n. 1. 2023.
doi.org/10.24021/raac.v20i1.7433.

PESSANHA, L. A.; MARIANA SILVA FERREIRA; BUENO, C.; FRANCIS; DANIEL FAUSTINO GOMES. Danger under wheels: mammal roadkills in the threaten lowland Atlantic Forest in southeast Brazil. **Iheringia Serie Zoologia**, v. 113. 2023.
doi.org/10.1590/1678-4766e2023007.

TUZUKI, L. L.; FREDERICO; RIBEIRO, L.; DE, P.; LEVY CARVALHO GOMES; ADRIANA REGINA CHIPPARI-GOMES. Effects of manganese on fat snook *Centropomus parallelus* (Carangaria: Centropomidae) exposed to different temperatures. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 4, 18. 2017. doi.org/10.1590/1982-0224-20170054.

VLASOV, D., VASIL'CHUK, J., KOSHELEVA, N., KASIMOV, N. Dissolved and suspended forms of metals and metalloids in snow cover of megacity: partitioning and deposition rates in Western Moscow. **Atmosphere**, v. 11, n. 9, p. 907–907. 2020.
doi.org/10.3390/atmos11090907.

VIEIRA, E. A. Poluição De Córrego Por Água De Rodovia E Fontes Domiciliares Em Cravinhos, Sp. **Revista Monografias Ambientais**, v. 7, n. 7, 11. 2012.
doi:10.5902/223613085564.

XU, X.; XU, Y.; XU, H.; WANG, C.; JIA, R. Does the expansion of highways contribute to urban haze pollution?-evidence from Chinese cities. **Journal of Cleaner Production**. n, v. 314. 2021. doi. 10.1016/j.jclepro.2021.128018.