

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ELIZETE RODRIGUES DE MORAIS

**TOXICIDADE DE CÁDMIO PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS: REVISÃO
CENCIOMÉTRICA E BIOENSAIOS EM CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS**

DOIS VIZINHOS

2023

ELIZETE RODRIGUES DE MORAIS

**TOXICIDADE DE CÁDMIO PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS: REVISÃO
CENCIOMÉTRICA E BIOENSAIOS EM CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS**

**Cadmium toxicity for aquatic organisms: scientometric review and bioassays
in realistic concentrations**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias
I/Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Dr. Elton Celton de Oliveira

Coorientadora: Dra. Paula Fernandes Montanher

DOIS VIZINHOS

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos



ELIZETE RODRIGUES DE MORAIS

**TOXICIDADE DE CÁDMIO PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS: REVISÃO
CENCIOMÉTRICA E BIOENSAIOS EM CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS**

Trabalho de pesquisa de mestrado
apresentado como requisito para obtenção
do título de Mestre Em Ciências Agrárias da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR). Área de concentração:
Agroecossistemas.

Data de aprovação: 14 de Agosto de 2023

Dr. Elton Celton De Oliveira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Aliciane De Almeida Roque, Doutorado - Universidade Estadual do Centro Oeste
(Unicentro)

Dr. Karina Silvia Beatriz Miglioranza, Doutorado - Conicet-Instituto de Investigaciones Marinas
Y Costeras, Mar Del Plata University

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 14/08/2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido concluir mais essa etapa da minha vida. A todos da minha família que de uma forma ou outra sempre me apoiaram, em especial ao Fernando pela compreensão e paciência.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Elton Celton de Oliveira por aceitar me orientar, pela dedicação, paciência, contribuições e ensinamentos que me possibilitaram chegar até aqui.

À minha coorientadora professora Dra. Paula Fernandes Montanher pelas contribuições, ensinamentos e por sempre estar disposta em ajudar.

Agradeço à professora Dra. Nédia de Castilhos Ghisi pelas contribuições e à professora Dra. Alessandra Matte pelos ensinamentos e conversas descontraídas.

Às minhas amigas Aline e Karine Andressa que mesmo distantes sempre me apoiaram e torceram muito por mim. Em especial à Edilaine que foi minha grande incentivadora.

Às minhas colegas Ana Paula, Sandrieli, Camila, Thaís, Carolaine, Karine e Gabriela, que me auxiliaram no laboratório e me ajudaram sempre que precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa (Processo: 23064.040918/2021-85), ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV) pela bolsa (Processo: 23064.025330/2020-11).

Enfim, a todos que me apoiaram nessa trajetória e todos que contribuíram de alguma maneira para a realização dessa pesquisa. Muito obrigada!

RESUMO

O Cádmio (Cd) é um metal pesado extremamente tóxico e bioacumulativo, constituinte natural dos fertilizantes químicos fosfatados utilizados na agricultura, comumente lixiviado e depositado nos ambientes aquáticos. Com o objetivo de investigar sua toxicidade, o presente estudo foi conduzido por meio de uma revisão cienciométrica e por dois bioensaios, onde foram avaliadas distintas concentrações de Cd (permissiva, realística e perspectiva futura), 0, 5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Na revisão cienciométrica 3837 registros foram analisados no WoS, bibliometrix, programa CiteSpace e Microsoft Excel 2016. A China foi o país com mais publicações sobre o assunto e apresentou instituições com maior influência na área. "Heavy metals", "Toxicity" e "Cadmium" foram as palavras-chave mais utilizadas. Dentre os organismos fotossintetizantes, predominaram pesquisas com o filo Tracheophyta e Chlorophyta. Os peixes foram os animais mais utilizados entre os vertebrados. Nos invertebrados, os grupos abordados com maior frequência foram os moluscos e crustáceos, sendo o biomarcador de bioacumulação o mais avaliado em todos os grupos. O bioensaio com sementes de *Allium cepa* teve como objetivo avaliar a bioacumulação, fitotoxicidade e citogenotoxicidade de Cd. Foram distribuídas 25 sementes em caixas Gerbox forradas com papel germitest. As soluções teste foram pipetadas em volume de 2,5 vezes o peso do papel, sendo incubadas por 240h a 20 °C em B.O.D com fotoperíodo (12/12h). A germinação foi significativamente menor em todas as concentrações de Cd quando comparadas ao controle negativo. O comprimento da radícula não apresentou variação entre os grupos. A partir do Índice de Aberrações Cromossômicas constatou-se um aumento significativo de danos citogenotóxicos em todas as concentrações de Cd, tendo a de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ o maior efeito. O dano que apresentou maior frequência em todas as concentrações foi C-metáfase, seguido por quebra cromossômica. A menor concentração de Cd foi a que provocou maior incidência de aderências, pontes anafásicas e de C-metáfases. Devido os peixes serem organismos extremamente expostos à contaminantes aquáticos, foi utilizado a espécie *Rhamdia quelen* para avaliar os efeitos de Cd na sobrevivência e desenvolvimento embrio-larval. Cinco ovos fertilizados/poço foram alocados em 20 microplacas de 24 poços, contendo 2,5 ml das soluções teste e incubados em B.O.D a 25 °C por 96h. A taxa de sobrevivência foi extremamente reduzida em todas as concentrações testadas, sendo observado sobreviventes acima de 10% apenas no grupo controle e na menor concentração de Cd em 96 horas pós fertilização (hpf). Foi observado um aumento gradativo das deformidades pela concentração de Cd em 48hpf. A área corporal foi consistentemente reduzida nas maiores concentrações após 48hpf e também em 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ após 96hpf. Conclui-se que concentrações permissivas e realísticas de Cd são fitotóxicas, citogenotóxicas, bioacumulativas e apresentaram efeitos severos sobre as fases iniciais dos peixes, representando um risco elevado à manutenção das populações, em caso de biodisponibilidade.

Palavras-chave: cenciometria; aberrações cromossômicas; embriotoxicidade; sobrevivência; metal pesado.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is an extremely toxic and bioaccumulative heavy metal, a natural constituent of phosphate chemical fertilizers used in agriculture, commonly leached and deposited in aquatic environments. In order to investigate its toxicity, the present study was conducted through a scientometric review and two bioassays, where different concentrations of Cd were evaluated (permissive, realistic and future perspective), 0, 5, 50 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. In the scientometric review, 3837 records were analyzed in WoS, bibliometrix, CiteSpace and Microsoft Excel 2016. China was the country with the most publications on the subject and presented institutions with the greatest influence in the area. "Heavy metals", "Toxicity" and "Cadmium" were the most used keywords. Among the photosynthetic organisms, research with the phylum Tracheophyta and Chlorophyta predominated. Fish were the most used animals among vertebrates. In invertebrates, the most frequently addressed groups were molluscs and crustaceans, with bioaccumulation being the most evaluated biomarker in all groups. The bioassay with *Allium cepa* seeds aimed to evaluate the bioaccumulation, phytotoxicity, and cytogenotoxicity of Cd. 25 seeds were distributed in Gerbox boxes lined with germitest paper. The test solutions were pipetted in a volume of 2.5 times the weight of the paper, being incubated for 240h at 20° C in B.O.D with photoperiod (12/12h). Germination was significantly lower at all Cd concentrations when compared to the negative control. Radicle length did not vary between groups. Based on the Chromosomal Aberration Index, a significant increase in cytogenotoxic damage was observed in all concentrations, with 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ having the greatest effect. The damage that presented the highest frequency in all tested concentrations was C-metaphase, followed by chromosome breakage. The lowest concentration of Cd was the one that caused the highest incidence of adhesions, anaphase bridges and C-metaphases. Because fish are organisms extremely exposed to aquatic contaminants, the species *Rhamdia quelen* was used to evaluate the effects of Cd on survival and embryo-larval development. Five fertilized eggs/well were placed in 20 microplates of 24 wells, containing 2.5 ml of test solutions and incubated in B.O.D at 25° C for 96h. The survival rate was extremely reduced in all tested concentrations, with survivors above 10% being observed only in the control group and in the lowest Cd concentration at 96hpf. A gradual increase in deformities was observed by Cd concentration at 48hpf. Body area was consistently reduced at the highest concentrations after 48hpf and also at 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ after 96hpf. representing a high risk to the maintenance of populations, in case of bioavailability.

Keywords: scientometrics; chromosomal aberrations; embriotoxicity; survival; heavy metal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Número de publicações e citações entre 1974 e 2022 sobre a toxicidade do Cd em organismos aquáticos.....	30
Gráfico 2 – Geolocalização, rede de cooperação e explosão de citações de países que colaboram com as publicações sobre a toxicidade de Cd em organismos aquáticos	34
Gráfico 3 - Rede de cocitação de periódicos.....	36
Gráfico 4 – Palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em organismos aquáticos.....	38
Gráfico 5 - Redes da cooperação de países que mais contribuem com as publicações de toxicidade de Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes.....	45
Gráfico 6 - Rede de palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em fotossintetizantes.....	47
Gráfico 7 - Redes da cooperação de países que mais contribuem com publicações de toxicidade de Cd em organismos aquáticos vertebrados.....	52
Gráfico 8 - Rede de palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em vertebrados aquáticos	54
Gráfico 9 - Rede de palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em invertebrados aquáticos	61
Fotografia 1 – Bioensaio com sementes de <i>Allium cepa</i>	68
Fotografia 2 – Evolução do desenvolvimento de <i>Allium cepa</i> durante incubação....	69
Gráfico 10 – Taxa de germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a concentrações de Cd	72
Gráfico 11 - Frequência percentual das fases do ciclo celular das plântulas de <i>Allium cepa</i> expostas a concentrações de Cd	73
Fotografia 3 – Aberrações cromossômicas em células de <i>A. cepa</i> após a exposição a concentrações de Cd	75
Gráfico 12 – Aberrações cromossômicas observadas em plântulas de <i>Allium cepa</i> expostas a concentrações de Cd	77
Gráfico 13 – Índice integrado de biomarcadores (IBR) obtido a partir dos resultados de aberrações cromossômicas em plântulas de <i>Allium cepa</i> expostas a distintas concentrações de Cd	79
Fotografia 4 – Seleção dos ovos viáveis de <i>Rhamdia quelen</i> para o bioensaio.....	86
Fotografia 5 – Microplacas de 24 poços utilizadas no ensaio de embriotoxicidade de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a concentrações de Cd	86
Gráfico 14 – Sobrevivência das larvas de <i>R. quelen</i> expostas a concentrações de Cd.....	89
Fotografia 6 - Deformidades morfológicas das larvas de <i>R. quelen</i> expostas a Cd em 48 hpf	93
Fotografia 7 - Deformidades morfológicas das larvas de <i>R. quelen</i> expostas a Cd em 96 hpf	94
Gráfico 15 – Índice de deformidades e área corporal das larvas de <i>R. quelen</i> expostas a concentrações de Cd em 48hpf e 96hpf	95

Gráfico 16 – Efeitos da interação entre a concentração de Cd e o tempo de exposição no índice de deformidades e área corporal das larvas *R. quelen*96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As dez principais referências citadas sobre a toxicidade de Cádmio	31
Tabela 2 - Organismos e espécies fotossintetizantes mais utilizados em estudos de toxicidade de Cd.....	42
Tabela 3 - Principais substâncias e elementos avaliados em estudos de toxicidade de Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes.....	43
Tabela 4 - Biomarcadores usados para avaliar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes.....	44
Tabela 5 - Organismos e espécies mais utilizados em estudos de toxicidade de Cd em vertebrados aquáticos.....	49
Tabela 6 - Principais substâncias e elementos avaliados em estudos de toxicidade do Cd em vertebrados.....	51
Tabela 7 - Biomarcadores usados para avaliar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos vertebrados.....	51
Tabela 8 - Organismos e espécies mais utilizados em estudos de toxicidade de Cd em invertebrados aquáticos.....	57
Tabela 9 - Principais substâncias e elementos avaliados em estudos de toxicidade de Cd em invertebrados aquáticos	58
Tabela 10 - Biomarcadores usados para avaliar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos invertebrados.....	58
Tabela 11 – Bioacumulação de Cd em plântulas de <i>A. cepa</i> expostas a distintas concentrações de Cd.....	79
Tabela 12 - Grau de severidade das deformidades por categoria de danos	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	133
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Metal pesado Cádmio.....	16
2.2	Fontes de contaminação aquática por Cádmio.....	17
2.3	Biodisponibilidade de Cádmio em ambientes aquáticos.....	20
2.4	Toxicidade de Cádmio e interações com organismos.....	21
3	TOXICIDADE DE CÁDMIO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS: UMA REVISÃO CIENTÍFICA.....	25
3.1	Introdução.....	25
3.2	Material e métodos	26
3.2.1	Pesquisa e processamento de dados.....	26
3.2.2	Métodos científicos.....	27
3.2.3	Extração de dados com o Microsoft Excel.....	29
3.3	Resultados e discussão.....	29
3.3.1	Toxicidade do cádmio em organismos aquáticos: todos os registros.....	29
<u>3.3.1.1</u>	<u>Características de publicação e impacto</u>	<u>29</u>
<u>3.3.1.2</u>	<u>Países e Instituições</u>	<u>32</u>
<u>3.3.1.3</u>	<u>Análise de citação de fontes</u>	<u>36</u>
<u>3.3.1.4</u>	<u>Citação de Autores.....</u>	<u>37</u>
<u>3.3.1.5</u>	<u>Palavras-chave.....</u>	<u>37</u>
3.3.2	Toxicidade de Cádmio em organismos aquáticos fotossintetizantes.....	40
<u>3.3.2.1</u>	<u>Características de publicação e impacto.....</u>	<u>40</u>
<u>3.3.2.2</u>	<u>Organismos estudados.....</u>	<u>41</u>
<u>3.3.2.3</u>	<u>Substâncias avaliadas.....</u>	<u>42</u>
<u>3.3.2.4</u>	<u>Biomarcadores</u>	<u>43</u>
<u>3.3.2.5</u>	<u>Países.....</u>	<u>44</u>
<u>3.3.2.6</u>	<u>Palavras-chave.....</u>	<u>45</u>
3.3.3	Toxicidade do cádmio em organismos aquáticos vertebrados.....	48
<u>3.3.3.1</u>	<u>Características de publicação e impacto.....</u>	<u>48</u>
<u>3.3.3.2</u>	<u>Organismos estudados.....</u>	<u>49</u>
<u>3.3.3.3</u>	<u>Substâncias avaliadas.....</u>	<u>50</u>
<u>3.3.3.4</u>	<u>Biomarcadores.....</u>	<u>51</u>
<u>3.3.3.5</u>	<u>Países.....</u>	<u>52</u>

3.3.3.6	<u>Palavras-chave</u>	53
3.3.4	Toxicidade do cádmio em organismos aquáticos invertebrados.....	54
3.3.4.1	<u>Características de publicação e impacto</u>	54
3.3.4.2	<u>Organismos estudados</u>	56
3.3.4.3	<u>Substâncias avaliadas</u>	57
3.3.4.4	<u>Biomarcadores</u>	58
3.3.4.5	<u>Países</u>	59
3.3.4.6	<u>Palavras-chave</u>	59
3.4	Conclusão	61
4	CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS DE CÁDMIO E SEUS POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS SOBRE <i>ALLIUM CEPA</i> L.	63
4.1	Introdução	63
4.2	Materiais e métodos	64
4.2.1	Produto e concentrações.....	64
4.2.2	Preparo da solução de Cádmio.....	65
4.2.3	Espécie modelo.....	65
4.2.4	Bioensaio	66
4.2.5	Parâmetros fitotóxicos.....	67
4.2.6	Parâmetros citogenotóxicos.....	68
4.2.7	Bioacumulação	69
4.2.8	Análise estatística.....	70
4.3	Resultados e discussão	70
4.3.1	Fitotoxicidade	70
4.3.2	Citogenotoxicidade.....	72
4.3.3	Bioacumulação.....	78
4.4	Conclusão	80
5	SOBREVIVÊNCIA E DANOS MORFOLÓGICOS NA FASE EMBRIO-LARVAL DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> (SILURIFORMES) EXPOSTAS A CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS DE CÁDMIO.....	81
5.1	Introdução	81
5.2	Materiais e métodos	82
5.2.1	Produto e concentrações.....	82
5.2.2	Preparo da solução de Cádmio.....	83
5.2.3	Espécie modelo	83

5.2.4	Bioensaio.....	83
5.2.5	Taxa de sobrevivência	86
5.2.6	Deformidades morfológicas e área corporal.....	86
5.2.7	Análise estatística.....	87
5.3	Resultados e discussão.....	88
5.3.1	Taxa de sobrevivência.....	88
5.3.2	Deformidades morfológicas e área corporal.....	91
5.4	Conclusão.....	97
6	CONCLUSÃO GERAL.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente urbanização e os avanços nos processos industriais e agrícolas, resultaram no aumento da disponibilidade de contaminantes nos ambientes naturais, inclusive metais pesados como o Cádmio (Cd) (LIU *et al.*, 2023), o qual vem sendo identificado nos agroecossistemas e ambientes aquáticos em concentrações cada vez mais elevadas.

O processo de modernização da agricultura trouxe consigo o desenvolvimento e emprego cada vez mais expressivo de máquinas e dos insumos agrícolas. Com a finalidade de aumentar a produção de alimentos, passou-se a fazer o uso indiscriminado de agrotóxicos, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros (BORSOI *et al.*, 2014). Outra característica predominante da agricultura moderna é a monocultura, geralmente praticada em grandes extensões de terras. Essa técnica ocasionou grandes transformações e homogeneização das paisagens (GROOT *et al.*, 2021). Além da utilização dos agrotóxicos, também passou a ser necessário a utilização dos fertilizantes para que as demandas de nutrientes das plantas pudessem ser atendidas garantindo seu desenvolvimento e consequentemente a alta produtividade (MIKULA *et al.*, 2020).

Embora a utilização de fertilizantes químicos propicie a reposição de nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal, eles podem se tornar importantes fontes de poluição, contaminando solos, águas e as próprias plantas por metais pesados, que são oligoelementos não essenciais com capacidades tóxicas e bioacumulativas (MENDES *et al.*, 2010).

Dentre os fertilizantes químicos, os fosfatados são os que apresentam maiores teores de Cd em sua composição, pois são obtidos a partir de rochas fosfáticas (sedimentares), ricas em fósforo e cálcio, mas também em Cd (MAR; OKAZAKI, 2012; QAMOUCHE *et al.*, 2020). A faixa de concentração média de Cd em rochas fosfáticas em escala mundial é de 0,035 a 243 mg kg⁻¹, mas já foram registrados teores de 507 mg kg⁻¹, sendo insignificantes as perdas de Cd durante o processo de produção dos fertilizantes, visto que não há meios de sua remoção (MAR; OKAZAKI, 2012). Isso faz com que a entrada de Cd nos solos seja intensificada, muito além da velocidade natural que se esperaria por processos físicos, químicos ou biológicos.

Tendo em vista que o Cd é um metal bioacumulativo, ele pode ser acumulado nos tecidos dos organismos e, posteriormente, biomagnificado na cadeia alimentar, atingindo diferentes níveis tróficos (DA COSTA ARAÚJO; DE ANDRADE VIEIRA; MALAFAIA, 2020) e chegar até o homem por meio da ingestão de alimentos com concentrações mais elevadas desse metal (KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021). Quando inserido no organismo humano, se acumula em tecidos e órgãos importantes, principalmente rins e fígado. A exposição prolongada ocasiona distúrbios reprodutivos, doenças ósseas e aumenta a probabilidade para o desenvolvimento de câncer (CARVALHO *et al.*, 2017; CARNE *et al.*, 2021).

Ademais, o Cd pode colocar em risco a vida aquática, uma vez que exerce efeitos no metabolismo, comportamento, morfologia, crescimento, reprodução e sobrevivência de diversos grupos animais (KESSABI *et al.*, 2023). Os peixes, por exemplo, são extremamente vulneráveis à toxicidade do Cd, pois ingerem continuamente a água para manter suas funções metabólicas (LEE *et al.*, 2023) e se alimentam de invertebrados e fitoplâncton, os quais podem apresentar bioacumulação de Cd (DAS; KAR; PATRA, 2023). A toxicidade expande-se também aos organismos aquáticos fotossintetizantes. Nas plantas, o efeito pode ser letal pois compromete diversas funções fisiológicas, provocando a redução da absorção de nutrientes, crescimento e inibição da fotossíntese (DENG, *et al.*, 2014).

A presença de Cd pode provocar a perda da biodiversidade aquática e, consequentemente, contribuir para a extinção de espécies (MARQUES, *et al.*, 2022). Seus efeitos tóxicos são relatados mesmo em baixas concentrações (PAUL; SMALL, 2019; SIERRA-MARQUEZ *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2021; KIRAN; BHARTI; SHARMA, 2021; ZHENG *et al.*, 2021), representando um risco às comunidades aquáticas e aos serviços ecossistêmicos, provocando redução na produtividade, prejudicando a ciclagem de nutrientes, a regulação da qualidade da água e controle de pragas, deixando o ecossistema mais instável e menos resistente a catástrofes (MEENA; JHA, 2023).

A fim de avaliar a toxicidade de elementos, como o Cd, são utilizados modelos biológicos, como vegetais ou animais, para mensurar os danos, rotas e as formas de ação de uma substância, bem como as respostas dos organismos à determinadas concentrações e tempo de exposição (DRUART *et al.*, 2010; CLÉMENT *et al.*, 2014). Isso também serve de base para determinação dos limites máximos aceitáveis das substâncias, os quais norteiam as legislações.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo investigar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos por meio de uma revisão cienciométrica e através da exposição controlada de dois modelos biológicos, de níveis tróficos distintos, a concentrações realísticas do metal. A revisão cienciométrica incluiu 3.837 estudos que abordaram a toxicidade de Cd em organismos aquáticos, posteriormente, a fim explorar de maneira mais detalhada, os dados foram agrupados e analisados em subconjuntos: organismos fotossintetizantes, vertebrados e invertebrados aquáticos. Este estudo representa o primeiro capítulo dessa dissertação de mestrado.

No primeiro bioensaio (Capítulo 2), foram utilizadas sementes de *Allium cepa* para avaliar os efeitos sobre os parâmetros fitotóxicos, bioacumulação e danos citogenotóxicos provocados pela exposição a distintas concentrações de Cd (permissiva, realística e perspectiva futura). Já para o segundo bioensaio (Capítulo 3) foi utilizado o peixe *Rhamdia quelen* (Quoy; Gaimard, 1824), em fase inicial de desenvolvimento, no qual foi avaliada a sobrevivência, deformidades morfológicas e morfometria após ensaio agudo com as concentrações de Cd já empregadas no ensaio anterior: permissiva, realística e uma representando uma estimativa futura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metal pesado Cádmio

O Cádmio (Cd) ocorre na natureza na forma de impureza do minério de zinco (VIEIRA *et al.*, 2015) e é classificado como metal pesado, pois apresenta densidade da massa atômica acima de 5 g/cm^3 (BARAKAT, 2011; GHUGE *et al.*, 2023; KIRAN; BHARTI; SHARMA, 2022). É um oligoelemento e também conhecido como metal-traço, por se tratar de um elemento químico que, naturalmente, deveria ser encontrado em concentrações muito baixas no meio ambiente (LAU *et al.*, 2021; ROMERO-ESTÉVEZ; YÁNEZ-JÁCOME; NAVARRETE, 2023). Entretanto, as ações antrópicas vêm ocasionando o aumento de sua concentração nos ambientes naturais, sendo extremamente tóxico e bioacumulativo nessas condições (MENDES *et al.*, 2010).

Metais não essenciais, como Cádmio, Chumbo, Cromo, Mercúrio, etc., exercem pouca ou nenhuma atividade benéfica às funções biológicas dos organismos biológicos (FASAE; ABOLAJI, 2022; KIRAN; BHARTI; SHARMA, 2022), provocando em geral efeitos letais ou subletais graves. Por outro lado, há metais essenciais, como por exemplo Ferro, Manganês, Zinco, entre outros, que em concentrações adequadas contribuem para o bom funcionamento dos organismos, desempenhando funções metabólicas importantes (JOMOVA *et al.*, 2022; ROMERO-ESTÉVEZ; YÁNEZ-JÁCOME; NAVARRETE, 2023).

O Cádmio é solúvel em água e seus efeitos tóxicos são observados até mesmo em baixas concentrações (KIRAN; BHARTI; SHARMA, 2022). Além disso, é persistente, bioacumulativo, não degradável e comumente encontrado nos solos e ambientes aquáticos, acumulando-se em plantas e organismos (LIU *et al.*, 2023) e provocando diversos danos. Dessa maneira, se insere na cadeia alimentar, atingindo distintos níveis tróficos, podendo chegar até ao homem e ocasionar um sério problema de saúde pública (PEERA SHEIKH KULSUM *et al.*, 2023).

A bioacumulação é caracterizada pela retenção de determinada substância em um organismo, seja em tecidos ou músculos, a qual não é eliminada após absorção e processo de excreção (GHOSH; MAL; MANDAL, 2020). A transferência trófica de uma substância acumulada pode resultar na biomagnificação, fazendo

com que a bioconcentração seja ainda maior nos organismos expostos (PEERA SHEIKH KULSUM et al., 2023).

Esses fatos são preocupantes, considerando que o Cd é extremamente tóxico e comumente encontrado nos ecossistemas aquáticos, muitas vezes acima dos limites máximos permitidos e atualmente estabelecidos. A legislação ambiental brasileira estabelece concentrações máximas permitidas para Cd em ambientes aquáticos a fim de manter padrões seguros para os seus diferentes usos (consumo, recreação, pesca, dessedentação, irrigação, etc.). Atualmente, a qualidade das águas superficiais é mensurada conforme a sua destinação, tendo como base os critérios e limites estabelecidos na Resolução CONAMA nº 357/2005, que define, por exemplo, a concentração máxima de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd para rios classes 1 e 2 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para os de classes 3 e 4 (CONAMA, 2005).

Para águas subterrâneas, a questão está normatizada pela Resolução CONAMA nº 396/2008, sendo admitido um limite máximo de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd para as águas destinadas ao consumo humano e/ou para recreação, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para irrigação e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para dessedentação de animais (CONAMA, 2008). Os padrões de potabilidade da água destinada ao consumo humano estão regidos pela Portaria GM/MS nº 888/2021, que estabelece um limite máximo admissível de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd na água potável (BRASIL, 2021), sendo abaixo do limite anterior que era de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Portaria GM/MS nº 5/2017).

Em âmbito mundial, nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (US EPA) estabelece a concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ como limite máximo permitido para Cd em água potável. Essa mesma concentração também é definida como o valor máximo permitido pela diretiva 2020/2184 da União Europeia (UE) para água destinada ao consumo humano. No entanto, o valor médio comumente encontrado em rios e lagos de água doce em todo o mundo é de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e em áreas sob influência agrícola, como é o caso da América do Sul, esse valor é ainda maior, atingindo $63,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (ZHOU *et al.*, 2020), concentrações essas bem acima dos limites máximos permitidos pelas legislações mundiais, e que podem colocar em risco a biota aquática.

2.2 Fontes de contaminação aquática por Cádmio

A poluição causada por metais pesados, dentre eles o Cd, vem despertando preocupação por acometer diversas áreas geográficas e por desencadear sérios efeitos nocivos (TANG *et al.*, 2023). Além disso, apresenta distintas fontes de poluição, fazendo com que o aumento das concentrações nos ecossistemas seja acentuado.

As fontes de entrada de Cd nos ambientes de água doce podem ser tanto de origem natural quanto provenientes das ações antrópicas. O ingresso natural de Cd ocorre por meio do intemperismo de rochas, processos erosivos, principalmente de margem e de lixiviação, atividades vulcânicas e incêndios florestais (KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021; KIRAN; BHARTI; SHARMA, 2022). Já as fontes antrópicas, que promovem a contaminação, são oriundas das atividades agrícolas, processos industriais, mineração, queima de combustíveis fósseis, entre outros (KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021; ROMERO-ESTÉVEZ *et al.*, 2023).

Das fontes naturais, as rochas sedimentares geralmente apresentam uma quantidade mais elevada de Cd, embora outros tipos de rochas também possuam esse metal como constituinte, e por meio do intemperismo, o Cd acaba sendo naturalmente alocado nos solos aumentando assim a sua concentração (LIAO *et al.*, 2022). Por mais que ocorra a deposição e redistribuição de Cádmio por maneira natural, as fontes antropogênicas são as principais responsáveis pela contaminação dos recursos naturais por esse metal. O cádmio é um elemento amplamente utilizado em processos industriais, estando presente em pilhas e baterias, em pigmentos/tintas, na estabilização de plásticos, revestimentos e galvanização, entre outros (YUAN *et al.*, 2019).

Por ser muito utilizado em atividades industriais, sua presença acaba sendo bastante elevada nas águas residuais e sua persistência faz com que a eliminação seja bastante difícil durante o tratamento. Os principais efluentes industriais com elevadas cargas de Cd são os oriundos da fabricação de baterias e eletrônicos, produção têxtil e de plásticos, drenagem de minas e outros (VILLEN-GUZMAN *et al.*, 2021; YUAN *et al.*, 2019).

Nas indústrias têxteis e na fabricação de plásticos são utilizados corantes à base de Cd para dar cor aos tecidos e principalmente polímeros, resultando na presença do metal em diversos produtos finais que são utilizados no cotidiano (ANGELIN *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2023). Sua utilização tem se tornado cada vez mais restrita por meio da implementação de legislações mais

severas, devido sua alta toxicidade e capacidade de desencadear impactos ambientais (ANGELIN *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2023).

A mineração do carvão é outra importante fonte de entrada de Cd nos compartimentos ambientais (TANG, 2023), assim como às atividades agrícolas, principalmente quando não se há um manejo adequado da produção. A principal porta de entrada do Cd nesses sistemas produtivos caracteriza-se pelo elevado uso de fertilizantes químicos, além do fato de alguns inseticidas e fungicidas também possuírem Cd em sua composição (JEONG *et al.*, 2023).

Os principais fertilizantes que contém metais pesados são os fosfatados, os quais podem inserir na cadeia alimentar elementos como o cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e mercúrio (Hg). Esses metais presentes nos fertilizantes são oriundos da presença natural em rochas fosfáticas e que não são eliminados durante o processo de fabricação (MENDES *et al.*, 2010). São elementos que não podem ser criados, mas são transportados e redistribuídos através das ações antrópicas (KRAEMER; CAMPBELL; HARE, 2006). Diferente dos processos naturais, essa redistribuição faz com que as concentrações nos solos aumentem substancialmente e passem a não ser seguras, tanto para a biota quanto aos humanos.

Outra ação que promove a deposição de Cd nos solos e, posteriormente nas águas é a aplicação de esterco animal sobre o solo, com intuito de fertilizá-lo a baixo custo; prática bastante comum em pequenas propriedades no sul do Brasil. Por mais que essa ação propicie a reposição de matéria orgânica e, conseqüentemente, nutrientes no solo, também insere metais pesados e outros compostos, provenientes de aditivos inseridos na ração como também pela ingestão de plantas com acúmulo de Cd e outros oligoelementos (ZHENG *et al.*, 2022).

A agricultura é uma das grandes responsáveis pela redistribuição de Cd e de outros metais pesados tanto no solo quanto nas águas superficiais. Considerando que comumente é feito o uso de fertilizantes e esterco nas lavouras, a concentração de Cd no solo acaba aumentando, o qual é absorvido e acumulado pelas plantas. Além disso, uma vez presente no solo pode ser transportado e depositado nos ambientes aquáticos por meio de processos erosivos e escoamento superficial, bioacumulando-se nos organismos que ali habitam e causando diversos danos, cujos impactos podem ser estendidos para toda uma bacia hidrográfica (SOMPRASONG; ASSAWADITHALERD, 2021; ZHANG *et al.*, 2020).

2.3 Biodisponibilidade de Cádmio em ambientes aquáticos

Por ser solúvel em água, a presença de Cd em ambientes aquáticos desperta ainda mais preocupações, pois os organismos ficam ainda mais expostos. Entretanto sua toxicidade está relacionada à biodisponibilidade (MIRANDA *et al.*, 2021). Biodisponibilidade é definida pela capacidade que uma determinada substância tem de ser absorvida e bioacumulada por um organismo, no qual exerce efeitos tóxicos, prejudicando o seu funcionamento (NAIDU *et al.*, 2008).

A disponibilidade de Cd na água é determinada pela ação de múltiplos fatores, que vão desde as características hidrogeoquímicas, sedimentológicas e climáticas da bacia até o uso e ocupação predominantes do seu entorno, com as diferentes fontes de contaminação. Assim, a toxicidade do Cd e de outros metais dependerá da interação desses fatores com a biota nas escalas espacial e temporal (MIRANDA *et al.*, 2021).

A biodisponibilidade de Cd em ecossistemas aquáticos é diretamente afetada pela temperatura, pH, salinidade, presença de substâncias orgânicas e químicas. Como é um ambiente natural, há alterações constantes desses componentes e parâmetros, fazendo com que a biodisponibilidade também seja alterada, em alguns momentos o Cd vai estar mais disponível aos organismos, desencadeando efeitos tóxicos mais severos e em outros vai apresentar menor biodisponibilidade, reduzindo assim a suscetibilidade da biota (JEONG *et al.*, 2023).

A temperatura exerce influência direta na capacidade de absorção e eliminação de Cd. Temperaturas mais elevadas resultam em maiores taxas de absorção do metal e, conseqüentemente maiores efeitos tóxicos, considerando que quanto maior a temperatura menor a taxa de oxigênio dissolvido, o metabolismo dos organismos acelera fazendo com que absorvam mais água para retirar oxigênio. A biodisponibilidade também depende da salinidade, quanto menor, mais disponível estará o Cd, pois a salinidade interfere diretamente na sua mobilidade (MIRANDA *et al.*, 2021).

O pH é outro fator determinante, em águas mais ácidas o Cd apresenta maior potencial de absorção, além disso, ocorre a intensificação da transferência desse e outros metais do sedimento para a água (JEONG *et al.*, 2023). Também ocorre a influência da presença de microplásticos em ambientes aquáticos, pois estes além

de possivelmente apresentar Cd em sua constituição, possuem a capacidade de se ligar aos metais, intensificando o processo de bioacumulação (KHALID *et al.*, 2021).

Os poluentes orgânicos persistentes como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), pesticidas, inseticidas e fármacos, interagem com Cd e outros metais, alterando os potenciais tóxicos desses oligoelementos (JEONG *et al.*, 2023). Os poluentes orgânicos persistentes possuem afinidade lipídica e aumentam a fluidez da membrana celular, favorecendo a entrada e bioacumulação de Cd e outros contaminantes nas células (GAUTHIER *et al.*, 2014).

Ainda sobre o efeito de substâncias orgânicas presentes nos ambientes aquáticos, alguns nutrientes, como por exemplo o Fósforo Total, favorece a absorção de metais pesados. Já o carbono orgânico total complexa e imobiliza o Cd, transferindo o metal da água para o sedimento (MIRANDA *et al.*, 2021).

Além da constituição físico-química, os parâmetros biológicos também exercem influência na biodisponibilidade de oligoelementos, a presença de biofilmes por exemplo, interfere na mobilidade e concentrações desses poluentes nos ambientes aquáticos por meio dos processos de bioacumulação e degradação. Outros fatores que influenciam são a presença de sólidos dissolvidos e sedimento, os quais podem acumular e reter parte da concentração de Cd e outros contaminantes (HUA *et al.*, 2019).

Todas as interações apresentadas são primordiais para determinar a biodisponibilidade do Cd, bem como a intensidade dos efeitos tóxicos provocados pela exposição. Vale ressaltar ainda que a biodisponibilidade é proporcionalmente mutável de acordo com alterações dos padrões físico-químicos e concentrações de outras substâncias presentes da água.

2.4 Toxicidade de Cádmio e interações com organismos

Um dos oligoelementos mais tóxicos para os organismos aquáticos é o Cd, o qual pode ser absorvido por meio da ingestão, respiração, adsorção (LIU *et al.*, 2017) e/ou por via cutânea (HAS-SCHÖN *et al.*, 2015). Cada espécie responde de uma maneira a contaminação por Cd em determinada concentração, sendo documentada na literatura a ocorrência de efeitos toxicológicos severos, tais como desregulação endócrina (LIU *et al.*, 2017), alterações morfológicas, disfunções reprodutivas e renais, danos ao DNA, toxicidade no fígado, redução do crescimento,

desenvolvimento do estresse oxidativo e até mesmo comprometer a viabilidade populacional das espécies (CHENG, et al. 2021; KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021).

Conforme abordado anteriormente, o Cd possui efeito bioacumulativo, que consiste em um aumento das concentrações do elemento químico nos tecidos (WANG, 2016), caracterizando-se pela retenção resultante da absorção e eliminação de contaminantes (BORGÅ, 2013). A suscetibilidade e os níveis de acumulação dependem de alguns fatores, como, por exemplo, fatores genéticos e fisiológicos dos indivíduos e espécies, pH do ambiente em que estão inseridos, temperatura, salinidade da água, disponibilidade e concentração de Cd no ambiente (ZHANG; REYNOLDS, 2019) e tempo de exposição.

Em peixes, o Cd pode se acumular e interferir no funcionamento de distintos órgãos como, por exemplo, rins, fígado, brânquias, intestino, cérebro, ovários, entre outros. O sistema digestivo, por exemplo, é diretamente afetado pela bioacumulação desse metal, interferindo na metabolização de nutrientes e equilíbrio eletrolítico, na resposta imune e, por consequência no crescimento dos animais. Todos esses efeitos estão também associados ao aumento substancial da taxa de mortalidade (DAS; KAR; PATRA, 2023). Adicionalmente, o Cd apresenta efeito colinérgico documentado na literatura, sendo considerado um elemento neurotóxico (SOLA *et al.*, 2022), uma vez que interfere na homeostase de concentração citosólica de Ca^{2+} , bloqueando a liberação de neurotransmissores dependentes dos íons de cálcio (MÉNDEZ-ARMENTA; RIOS, 2007), o que provoca alterações comportamentais (ZHANG et al., 2023a) em peixes e invertebrados aquáticos.

Além disso, o Cd desencadeia o estresse oxidativo por meio do aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem sobrecarregar as defesas antioxidantes, resultando no aumento da peroxidação lipídica (LPO) e danos ao DNA (LIU; QU; KADIISKA, 2009). No estresse oxidativo há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e de enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. O aumento do ambiente oxidativo tende a provocar rompimento das membranas celulares (lipídicas), danos às proteínas e também a potencial ativação do mecanismo de morte celular (MÉNDEZ-ARMENTA; RIOS, 2007).

Além da bioacumulação observada em plantas, o Cd diminui a taxa de germinação de sementes e interfere na sua fisiologia, comprometendo o

desenvolvimento como um todo. O Cd presente no solo, por exemplo, é absorvido através da membrana plasmática das células das raízes por meio de transportadores de metais essenciais, sendo posteriormente translocados às partes aéreas das plantas (LI *et al.*, 2023). O Cd também inibe a síntese de clorofila e, conseqüentemente, compromete a fotossíntese (FAN *et al.*, 2023) por meio do fechamento estomático e da inibição de ferro (Fe^{2+}). O ferro está associado à elevação dos teores de clorofila e síntese de pigmentos responsáveis pela captação de luz (HAIDER *et al.*, 2021), uma vez que é inibido, conseqüentemente afeta a fotossíntese.

Uma vez que são absorvidos pelos mesmos transportadores, o Cd compete com a absorção de nutrientes essenciais, o que resulta na deficiência destes, comprometendo assim o crescimento e produtividade (ANDRESEN *et al.*, 2023). Além disso, pode causar a morte da planta, considerando que também provoca danos aos órgãos vegetativos (raízes, caules e folhas) e clorose foliar (LI *et al.*, 2023).

Considerando a capacidade bioacumulativa do Cd e todas as evidências toxicológicas já apresentadas para plantas e animais, torna-se evidente que efeitos nocivos também podem ser estendidos aos humanos, mesmo em baixas concentrações. A exposição crônica a esse oligoelemento promove mal funcionamento do sistema imunológico, aumenta a probabilidade do desenvolvimento de câncer, provoca doenças respiratórias, leva a insuficiência renal, causa alterações dos hormônios reprodutivos, malformações congênitas, danos ósseos, (LIN *et al.*, 2023), problemas de fígado, visão e cardiovasculares (GENCHI *et al.*, 2020).

A exposição prolongada ao Cd, em solos contaminados, pode resultar na doença Itai- itai, a qual se caracteriza por insuficiência renal e por uma combinação de dores ósseas, com osteoporose e osteomalácia, associadas a fraturas e deformidades (BABA *et al.*, 2013; INABA *et al.*, 2005).

A fim de mensurar as respostas das plantas e da biota à exposição de Cd e outros contaminantes e inferir sobre potenciais efeitos para a saúde humana, são utilizados modelos biológicos como bioindicadores de toxicidade. A espécie vegetal *Allium cepa* L. é amplamente utilizada em bioensaios por ser bastante sensível e apresentar resultados confiáveis a baixo custo. Além disso, é possível identificar alterações no seu ciclo celular e detectar aberrações cromossômicas (LEME;

MARIN-MORALES, 2009). Esse teste também permite mensurar as ações de substâncias sobre parâmetros fitotóxicos, tais como o crescimento radicular e a germinação (KASSA, 2021; SOUZA *et al.*, 2020).

Esse teste foi introduzido por Levan em 1938 e, posteriormente, alterado por Fiskesjö (1985) com o objetivo de transformá-lo em um organismo teste para o biomonitoramento ambiental. Essas alterações estavam relacionadas à detecção de efeitos genotóxicos (aberrações cromossômicas) e efeitos mutagênicos por meio da identificação de micronúcleos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Com a finalidade de identificar os potenciais efeitos adversos de diversos poluentes tóxicos, como por exemplo, metais pesados, também são utilizados embriões, eleuteroembriões e larvas de peixes como bioindicadores em ensaios ecotoxicológicos (BRITO *et al.*, 2018). A partir de respostas a exposição à contaminantes, é possível mensurar efeitos agudos e crônicos, incluindo letalidade/sobrevivência, anormalidades morfológicas, neurotoxicidade, estresse oxidativo e danos histopatológicos, mesmo em baixas concentrações (NOGUEIRA; CASTRO; SÁ, 2009). Para fins de definição, os eleuteroembriões compreendem as fases da incubação à fase de autoalimentação, ou seja, entre a fase embrionária e a fase larval (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O peixe *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), popularmente conhecido como jundiá, é uma espécie nativa de água doce com ampla distribuição geográfica e comumente encontrado na região sul do Brasil. Pertencente à classe Actinopterygii, ordem Siluriformes e família Heptapteridae é considerado um bom modelo experimental (GOMES *et al.*, 2000). Como apresenta rápida organogênese é amplamente utilizado em ensaios laboratoriais principalmente nas fases embrionárias e larvais (NAGAMATSU *et al.*, 2021).

Essas fases iniciais de desenvolvimento vêm sendo bastante utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, pois possuem a pele e o sistema imunológico imaturos e apresentam elevada taxa metabólica, portanto, são mais sensíveis à alteração da qualidade da água e ao estresse provocado pela exposição à contaminantes com potenciais tóxicos, sendo possível identificar alterações morfológicas, fisiológicas e letalidade de determinada concentração (AZEVEDO-LINHARES *et al.*, 2018); BARRETO *et al.*, 2020). As fases iniciais de desenvolvimento dos peixes são vitais para a manutenção das espécies e do equilíbrio dos ecossistemas naturais. Por ser uma fase extremamente sensível aos efeitos de poluentes, a presença de

contaminantes, como o Cd, em ambientes aquáticos, pode colocar em risco o equilíbrio e interferir na manutenção populacional das espécies.

Considerando as problemáticas registradas na literatura associadas ao Cd, bem como a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a toxicidade desse metal em distintos organismos, foi desenvolvido o presente estudo o qual é apresentado a seguir em 3 capítulos.

3 TOXICIDADE DE CÁDMIO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS: UMA REVISÃO CIENCIOMÉTRICA

3.1 Introdução

As ações antrópicas promovem a deposição de contaminantes no meio ambiente. Entre esses contaminantes tem sido identificado com frequência a presença de metais traço em altas concentrações, muitas vezes excedendo os limites de segurança estabelecidos pelas legislações ambientais competentes (MAHJOUB *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). Esses metais, incluindo o Cádmio (Cd), comumente atingem os ambientes aquáticos por meio de efluentes industriais, intemperismo de rochas, processos de lixiviação e escoamento agrícola, entre outras fontes (KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021). A presença de Cd em ambientes aquáticos representa risco de contaminação para as comunidades, considerando seu potencial tóxico e bioacumulativo (ZHANG *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2021).

Em ambientes aquáticos, o Cd foi sendo detectado em concentrações progressivamente mais elevadas entre as décadas de 1970 e 2010, sendo detectado atualmente em concentrações que variam de 5,7 (Europa) a 63,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (América do Sul), com uma média de $25,3 \pm 7,2 \mu\text{g. L}^{-1}$ (ZHOU *et al.*, 2020). Esses dados são alarmantes, pois excedem de 5 a 20 vezes os limites máximos recomendados pela Organização Mundial da Saúde e preconizados na legislação brasileira. Ademais, sua elevada solubilidade associada a capacidade de bioacumulação e magnificação na cadeia trófica tornam o assunto uma preocupação de saúde pública e conservacionista.

Os organismos aquáticos expostos ao Cd podem se contaminar através da absorção por via cutânea (HAS-SCHÖN *et al.*, 2015), ingestão, respiração e

adsorção (NAN, *et al.* 2016, SOUZA; 2012), podendo resultar em efeitos deletérios (ZHANG; REYNOLDS, 2019) e subletais, tais como desbalanço oxidativo, danos ao DNA, peroxidação lipídica, histopatologias diversas, desregulação endócrina, desenvolvimento e crescimento prejudicados, (HU *et al.*, 2021; PÉREZ-ALVAREZ *et al.*, 2021), além das malformações e efeitos carcinogênicos (PÉREZ-ALVAREZ *et al.*, 2021).

Tanto a fauna quanto a flora aquática sofrem com os diversos impactos provocados pela presença de Cd. Nos grandes grupos animais, como vertebrados e invertebrados, a exposição ao Cd aumenta expressivamente a mortalidade, o que pode comprometer a biodiversidade do ambiente e, conseqüentemente, o equilíbrio ecossistêmico. Já nas plantas e outros organismos fotossintetizantes, como fitoplâncton e algas, por mais que a exposição não provoque necessariamente a morte, causa uma intensa redução e até mesmo inibição do crescimento (ZHANG; REYNOLDS, 2019), o que também resulta em um desequilíbrio, considerando que constituem a base da cadeia alimentar de diversas espécies.

Considerando as evidências toxicológicas observadas em diferentes grupos taxonômicos expostos ao Cd e seu gradativo aumento nos ambientes aquáticos, analisar e sistematizar os resultados obtidos em pesquisas mundiais é fundamental para compreensão do problema em escala global. Uma maneira de analisar o estado da arte de um determinado assunto é realizando uma revisão cienciométrica, onde é possível identificar tendências sobre o assunto, estipular a influência, encontrar lacunas e, a partir disso, direcionar o interesse de futuras pesquisas da comunidade científica (VASCONCELOS *et al.*, 2022).

Assim, o objetivo geral do presente estudo é realizar uma revisão cienciométrica sobre a toxicidade do cádmio em organismos aquáticos, em nível global. Os objetivos específicos são: (I) revisar os estudos realizados em diferentes organismos, como organismos fotossintetizantes, vertebrados e invertebrados; (II) discutir como estão sendo conduzidas as pesquisas sobre a toxicidade do cádmio e como essas pesquisas podem direcionar novos estudos sobre o tema.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Pesquisa e processamento de dados

Os dados foram obtidos por meio de busca nas publicações disponíveis em todas as bases de dados do Web of Science (WoS) da Clarivate Analytics (<http://apps-webofknowledge.ez48.periodicos.capes.gov.br>). Os termos de pesquisa incluíram TS (Topic Search) = ("*toxicity AND cadmium AND aquatic organism*") abrangendo o período de 1945 a 2022. Um total de 6531 publicações foram encontradas entre 1974 e novembro de 2022. Em seguida, foi realizado o refinamento manual de cada publicação pela leitura dos títulos e resumos para selecionar os estudos que abordaram os efeitos tóxicos do Cd em organismos aquáticos. Um total de 2.694 publicações foram excluídas e 3.837 publicações utilizadas na base de dados final.

Para realizar o refinamento e compor a lista marcada, alguns critérios de inclusão foram utilizados. Foram incluídos estudos de bioacumulação, biorremediação, presença e efeitos do Cd (isolado ou em combinação com outros compostos) em organismos aquáticos como vertebrados, invertebrados, algas e plantas aquáticas, assim como experimentos realizados em laboratório, com condições controladas e avaliações realizadas *in situ*.

Posteriormente, os dados foram analisados em subconjuntos separados por grupo taxonômico. A primeira lista agrupou 666 estudos com organismos fotossintetizantes, a segunda incluiu 1.626 publicações que avaliaram vertebrados aquáticos, e a terceira e última lista, os que utilizaram invertebrados aquáticos, reunindo 1.573 estudos. Vale ressaltar que alguns estudos avaliaram mais do que um grupo de organismo, como por exemplo vertebrados e invertebrados, os quais foram contemplados em ambos subconjuntos, pois cada grupo taxonômico foi analisado de maneira independente. Uma vez classificados os dados, eles passaram pelo mesmo processo de análise da lista inicial, que incluía todos os organismos aquáticos.

As ferramentas WoS "Analyze Results" e "Create Citation Report" foram utilizadas para a análise das publicações e citações por ano e cálculo do índice H da base de dados. Para cada subconjunto foram identificados os tipos de documentos, ano de publicação, fonte e seu fator de impacto, categoria, país, autor e citações. Os dados dos registros refinados foram analisados no CiteSpace (CHEN, 2016), Microsoft Excel 2016 e a ferramenta R Bibliometrix. O fator de impacto das fontes foi obtido do Journal Citation Reports (JCR) (clarivate.com/products/web-of-science).

3.2.2 Métodos cienciométricos

O CiteSpace é um programa gratuito baseado em Java que roda dados apenas da coleção principal do Web of Science (WoS) a partir do ano de 1993. Desta forma, foi utilizado para formar redes e cocitações, mapear autores, países e periódicos, além de ajudar a identificar e visualizar os principais fatores que contribuem para a evolução do conhecimento na área de pesquisa. Os resultados do programa são expressos em infográficos, com um nó indicando os itens de busca e os *links* representando as citações entre esses nós (CHEN, 2004). Cada nó é caracterizado por uma série de anéis em cores diferentes que indicam a ordem cronológica de ocorrência de *links* e itens. Assim, o azul representa os itens mais antigos, enquanto os itens recentes aparecem em laranja, com um anel externo roxo indicando boa centralidade (CHEN, 2006).

A centralidade de intermediação é definida pela equação (1).

$$Centrality (node i) = \sum_{i \neq j \neq k} \frac{\rho_{jk}(i)}{\rho_{jk}}$$

(Equação 1)

Na Eq. (1), ρ_{jk} representa o número de caminhos mais curtos entre o nó j e o nó k , e $\rho_{jk}(i)$ é o número desses caminhos que passam pelo nó i . A importância de cada documento em uma rede de cocitação pode ser parcialmente avaliada pelo indicador de centralidade de mediação, que atribui características específicas de cada nó em uma determinada rede (KAMALI *et al.*, 2020). Os dados de palavras-chave de todos os conjuntos analisados foram submetidos à análise de cluster, que é uma análise em que objetos semelhantes são combinados para determinar áreas de estudo relacionadas. CiteSpace atribui ID zero (#0) ao maior cluster, ID um ao segundo maior e assim por diante (CHEN *et al.*, 2010). Explosões de citação são representadas pelos anéis vermelhos e evidenciam o crescimento acentuado e momentâneo na frequência de citação de um tópico, documento ou autor (KLEINBERG, 2003; KAMALI *et al.*, 2020).

O bibliometrix é uma ferramenta de código aberto agregada ao RStudio utilizada para realizar análises bibliométricas (ARIA; CUCCURULLO, 2017). O RStudio é um software livre integrado a linguagem de programação R que permite acesso ao aplicativo “biblioshiny”, o qual abre a interface bibliometrix na web e

permite a execução de análises abrangentes para o mapeamento científico (CAMPRA *et al.*, 2022). Desta forma, foi possível obter um gráfico das áreas geográficas com maior número de publicações e cooperação entre os países.

3.2.3 Extração de dados com o Microsoft Excel

A análise do CiteSpace não abrange todo o conjunto de dados devido às limitações do software (abrange apenas os dados da coleção principal do Web of Science (WoS) a partir do ano de 1993). Portanto, foi realizada a extração manual dos dados com os 3.837 registros obtidos na busca do WoS no programa Microsoft Excel 2016. Desse modo, foram extraídos os seguintes dados: título, ano, espécie, grupo animal, organismo/filo, tipo de estudo, substância avaliada, composto, biomarcador e análise realizada. Esses dados foram classificados e agrupados em 3 subconjuntos: organismos fotossintetizantes, vertebrados e invertebrados.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Toxicidade do cádmio em organismos aquáticos: todos os registros

3.3.1.1 Características de publicação e impacto

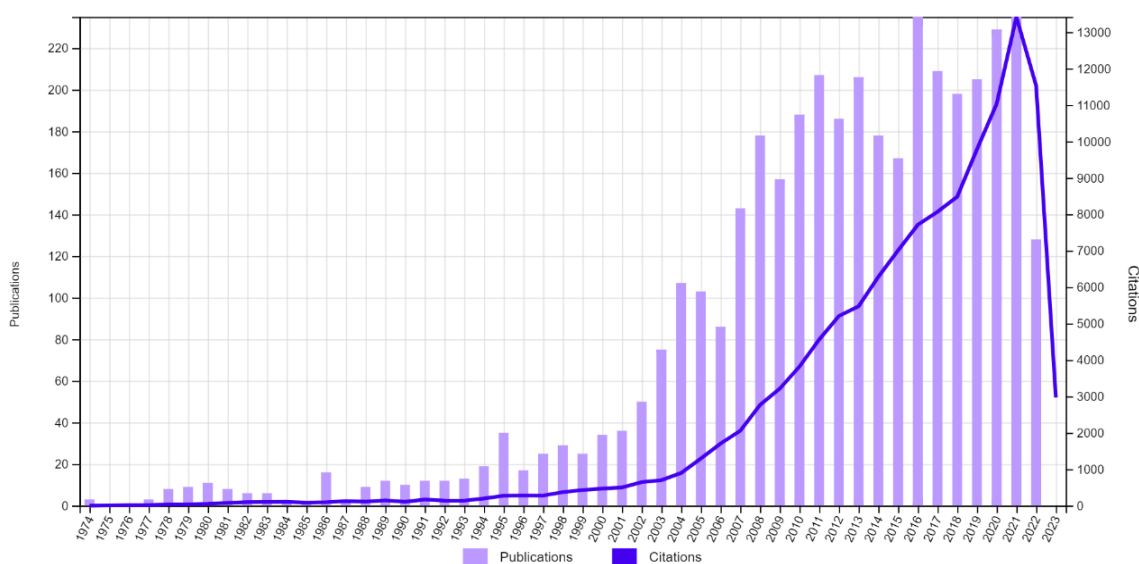
De acordo com os critérios utilizados, 3837 publicações foram obtidas englobando artigos, artigos de revisão, acesso antecipado, material editorial, livros, resumo e resumos de reuniões. Os artigos predominaram com 98.41% das publicações. O inglês foi o idioma predominante com 98.83% do total, seguido do espanhol, francês, português, alemão, japonês, coreano, turco, malaio e polonês. Os artigos do conjunto de dados foram citados 123.091 vezes, com uma média de 32.08 citações por item e um índice H de 124, o que significa que o conjunto de dados possui 124 artigos que foram citados pelo menos 124 vezes. O índice H revela o impacto ou relevância de um artigo, autor ou área (HIRSCH, 2005). Portanto, a análise de citações fornece informações importantes sobre o impacto científico da toxicidade do Cd em organismos aquáticos.

Publicações sobre esse tópico foram registradas desde 1974, conforme mostrado no Gráfico 1. Um aumento considerável no número de publicações e

citações nesta área foi observado nos últimos 20 anos, demonstrando o aumento do interesse em pesquisas sobre os efeitos adversos deste metal na biota aquática. A acentuada queda do número de publicações e citações a partir de 2022, justifica-se pelo refinamento não compreender o ano completo, pois a pesquisa dos dados compreendeu o período até início de novembro de 2022.

Esse grande volume de estudos sobre a toxicidade do Cd pode ser justificado por se tratar de um metal extremamente tóxico encontrado em ambientes aquáticos (DUAN *et al.*, 2021; PÉREZ-ALVAREZ *et al.*, 2021). Além disso, é cancerígeno, não biodegradável e bioacumulativo, afeta toda a biota e a saúde humana, desencadeando efeitos citogenotóxicos importantes e comprometendo a função de diversos órgãos (HAYAT *et al.*, 2019; GENCHI *et al.*, 2020 ; DUAN *et al.*, 2021; ŠÍROVÁ; VACULÍK, 2021; SUHANI *et al.*, 2021). Apesar de ser um metal tóxico, é amplamente utilizado em processos industriais, como fabricação de baterias, estabilização de plásticos, pigmentação, cerâmica, entre outros (GENCHI *et al.*, 2020). Também é introduzido pelo intemperismo natural, atividades agrícolas, mineração, indústrias de metais não ferrosos e incineração de resíduos (WANG *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2022).

Gráfico 1 - Número de publicações e citações entre 1974 e 2022 sobre a toxicidade do Cd em organismos aquáticos



A partir da ferramenta WoS "Create Citation Report", obteve-se a Tabela 1 com os 10 artigos mais citados em estudos de toxicidade do Cd em organismos

aquáticos. A tabela mostra o total de citações, citações médias anuais e informações sobre autores e ano de publicação. Estes artigos são leitura básica e essencial para pesquisadores neste campo.

Tabela 1 - As dez principais referências citadas sobre a toxicidade de Cádmio.

Classificação	Título	Autores, anos	Revista de Origem	Total de citações	Média por ano
1	Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms	Livingstone DR, 2001	MARINE POLLUTION BULLETIN	1409	61.26
2	Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?	Rainbow P. S., 2002	ENVIRONMENTAL POLLUTION	914	41.55
3	Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers	Amiard JC, Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., & Rainbow PS, 2006	AQUATIC TOXICOLOGY	902	50.11
4	Heavy metal-induced oxidative stress in algae	Pinto E., Sigaud-kutner TC., Leitao MA., Okamoto OK., Morse D., & Colepicolo P., 2003	JOURNAL OF PHYCOLOGY	787	37.48
5	Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals	Niyogi S., & Wood CM., 2004	ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY	533	26.65
6	Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae	Siripornadulsil S., Traina S., Verma DPS., & Sayre RT., 2002.	PLANT CELL	396	18
7	Aquatic toxicity testing using the nematode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	Williams PL., & Dusenbery DB., 1990	ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY	390	11.47
8	<i>Sargassum</i> seaweed as biosorbent for heavy metals	Davis TA., Volesky B., & Vieira RHSF., 2000	WATER RESEARCH	377	15.71
9	Heavy metals in water, sediment and tissues of <i>Leuciscus cephalus</i> from a stream in southwestern Turkey	Demirak A., Yilmaz F., Tuna AL., & Ozdemir N., 2006	CHEMOSPHERE	396	20.5
10	Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon	Dural M., Göksu M.ZL., & Özak AA., 2007	FOOD CHEMISTRY	342	20.12

Fonte: Autoria própria (2023)

O artigo "Produção de espécies reativas de oxigênio estimuladas por contaminantes e danos oxidativos em organismos aquáticos" de Livingstone (2001), foi o mais citado e aborda uma revisão sobre o processo de produção de espécies reativas de oxigênio e os danos oxidativos provocados em organismos aquáticos pela a exposição a poluentes, incluindo metais. Biomarcadores de estresse oxidativo são comumente empregados na análise da toxicidade de poluentes, o desequilíbrio entre a produção de oxidantes e os sistemas de defesa de um organismo, pode gerar danos celulares, genéticos e teciduais, comprometendo o desempenho do organismo no ambiente (SANTANA *et al.*, 2021). O segundo artigo, de Rainbow (2002), revisa a acumulação de metais em invertebrados aquáticos, relacionando os metais metabolicamente disponíveis aos detoxificados e armazenados. Os metais podem se incorporar nos tecidos dos organismos via bioacumulação, sendo um importante marcador para avaliar a contaminação por metais, a disponibilidade e o risco ecológico em ambientes aquáticos (XU *et al.*, 2022).

Os demais trabalhos avaliam a aplicabilidade do modelo biótico de ligantes (BLM) para desenvolver diretrizes de qualidade de água para metais (incluindo Cd) utilizando como base estudos toxicológicos com peixes e microcrustáceos (NIYOGI; WOOD, 2004) e os efeitos do Cd em diferentes organismos aquáticos, sua concentração em organismos coletados em campo e em produtos pesqueiros, bem como o uso da metalotioneína como um biomarcador em programa de biomonitoramento (AMIARD *et al.*, 2006).

A análise da ocorrência de publicações em categorias de áreas de pesquisa ajuda a detectar qual área se destaca em estudos de toxicidade do Cd em organismos aquáticos. As categorias mais frequentes de acordo com as análises do WoS são: Ciências Ambientais e Ecologia (2.337), Toxicologia (1.539), Biologia Marinha e de Água Doce (750) e Bioquímica e Biologia Molecular (298). Esses dados revelam que atualmente estão sendo realizados estudos de investigação do impacto ecológico e a toxicidade do Cd em organismos aquáticos.

3.3.1.2 Países e Instituições

As análises da origem das publicações são fundamentais para entender a distribuição geográfica dos países com os maiores índices de publicação (OUYANG *et al.*, 2018), inclusive na área de toxicidade do cádmio em organismos aquáticos,

verificando suas respectivas influências. Em um país, a frequência de citação mostra sua visibilidade em um determinado campo de pesquisa, já o *burst* de citação é um indicador de explosão de citações, mostrando a região mais ativa em um determinado período, durando um ou vários anos. Outra medida bastante importante é a centralidade, uma vez que revela a influência de um país em determinada área de estudo. É importante ressaltar que o tamanho do nó e da fonte está relacionado ao volume de publicação, enquanto os *links* representam as citações dessas publicações. Anéis roxos indicam centralidade e a presença de anéis internos vermelhos refere-se a explosões de citações (CHEN, 2016).

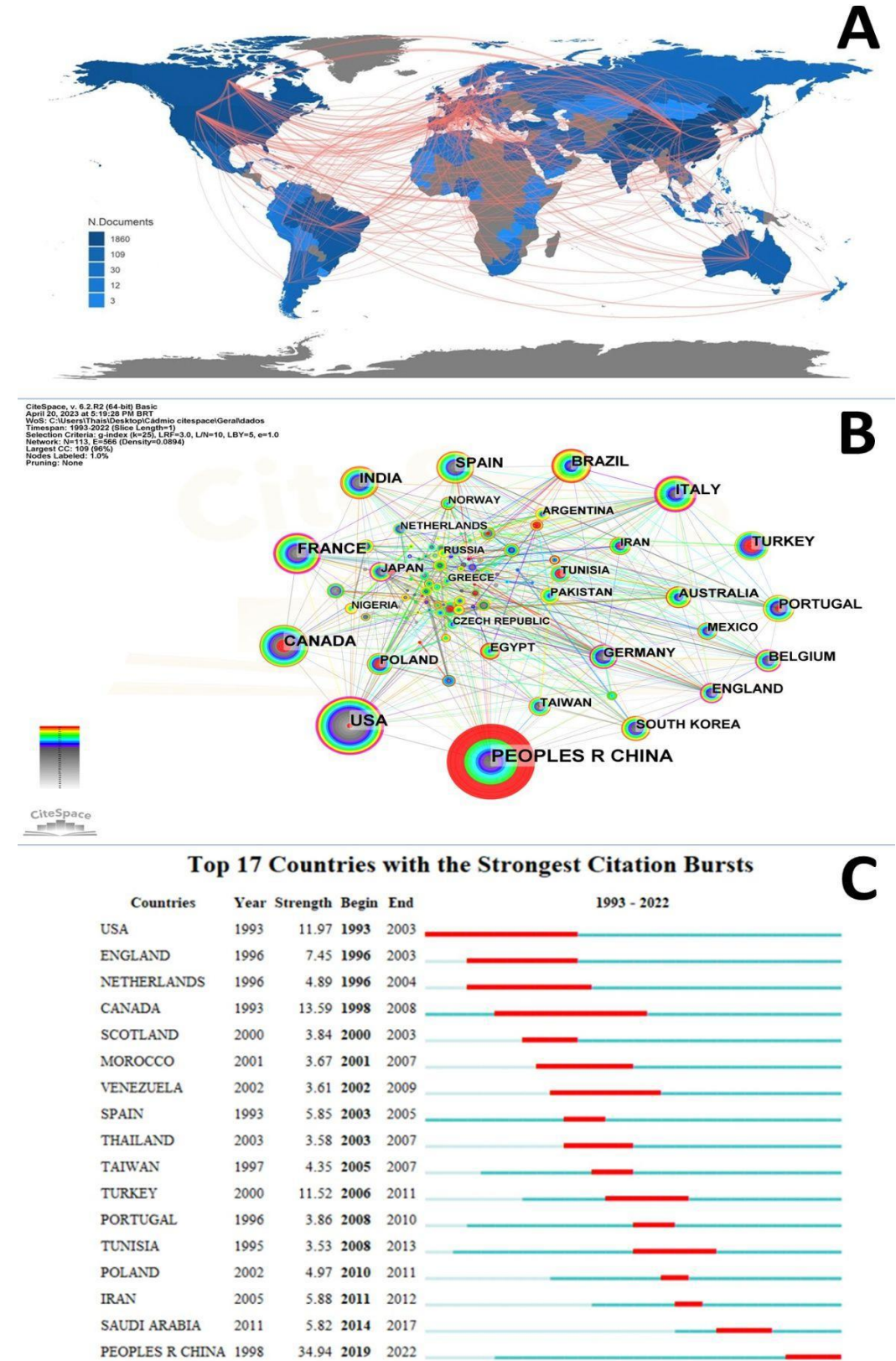
O gráfico 2A apresenta os países mais ativos em publicações sobre o tema e a colaboração entre eles. Os líderes em publicações científicas sobre a toxicidade do Cd foram a República Popular da China (749), seguida pelos Estados Unidos da América (460), Canadá (301), França (250) e Índia (212), concentrando as publicações na América do Norte, Europa e Leste Asiático. Essas análises da origem dos autores são fundamentais para mapear a relevância do tema do ponto de vista econômico, social e/ou ambiental, bem como para verificar onde há mais investimento em pesquisa científica (GHISI *et al.*, 2020).

O gráfico 2B mostra a centralidade e influência dos países, juntamente com a rede de cooperação entre os países, com destaque para a China, EUA, seguido de Canadá e França. A alta representatividade da China no volume de pesquisas e publicações pode ser justificada pelo aumento significativo do número de instituições de ensino e pesquisa nos últimos anos, impulsionado por políticas públicas voltadas para o crescimento econômico de longo prazo, ocasionando um aumento substancial de cientistas industriais e professores universitários, em que os incentivos à pesquisa pública resultaram em aumento da demanda por alocação profissional nessa área e redução da demanda por trabalho na rede privada (RONG; WU, 2020). Além disso, há incentivos e forte pressão para a publicação de dados, principalmente para recém-formados, que almejam ascensão profissional (WANG; LIU, 2019).

As explosões de citações (*burst*) são apresentadas no gráfico 2C e indicam que novamente a República Popular da China se destaca (34.94), também é possível observar que são explosões mais recentes dentre o conjunto de países, ou seja, é o país que vem apresentando o maior volume de citações, principalmente nos últimos anos (2019 a 2022). Por meio dessa análise, é possível deduzir que

essa área de pesquisa tem recebido maior atenção da comunidade científica. Outros países com *bursts* elevados são Canadá (13.59), EUA (11.97) e Turquia (11.52), este último, apesar de não ter tido um elevado número de publicação, obteve uma explosão de citações entre 2006 e 2011.

Gráfico 2 – Geolocalização, rede de cooperação e explosão de citações de países que colaboram com as publicações sobre a toxicidade de Cd em organismos aquáticos



A- Geolocalização do número total de publicações científicas sobre a toxicidade do cádmio em organismos aquáticos. B: Rede de cooperação de países até 25 países. C: Principais países com explosões de citações.

Fonte: Autoria própria (2023)

A França tem a maior centralidade (0.29), seguido dos EUA (0.27), Itália (0.22) e Alemanha (0.19), indicando que esses países têm maior influência nas pesquisas sobre toxicidade do Cd em organismos aquáticos. Embora alguns desses países não apresentem os maiores volumes de publicações, seus estudos são de grande relevância na comunidade científica, como é o caso da Alemanha e Itália. Embora a República Popular da China apresente maior número de publicações, possui baixa centralidade (0.10), ou seja, baixa influência em relação aos demais países.

A "Chinese Academy of Science" é a principal instituição que realiza pesquisas sobre a toxicidade do Cd em organismos aquáticos com uma frequência de 156 citações. Apresenta a maior centralidade do conjunto das instituições (0.28), com evidente influência neste campo de investigação. Outra instituição que se destaca é a "Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)" da França, apresentando uma frequência de 141 citações e uma centralidade de 0.15. A "Environment & Climate Change Canada" (Canadá) apresentou o *burst* de maior citação com 9.84, pelo período de 1999 a 2007, seguida pela "Laoshan Laboratory" (República Popular da China) com *burst* de 8.99, "Ministry of Agriculture & Rural Affairs" (República Popular da China) com um *burst* de 8.34, apresentando a maior explosão de citações de 2017 até os dias atuais. A "Chinese Academy of Science" possui diversos institutos de alta tecnologia, muitos dos quais financiados pelo governo visando o crescimento socioeconômico do país, e por isso, há uma alta cobrança para produzir resultados inovadores e significativos (XIONG et al., 2020).

Outra questão que explica a significativa participação da República Popular da China nas pesquisas é pelo fato de seus solos apresentarem uma representativa e severa contaminação por Cd (LI et al., 2022). A poluição por esse metal é histórica, com grandes índices de contaminação desde 1970, decorrentes do significativo desenvolvimento industrial da época (WANG et al., 2020). Outro fator relevante é o fato de a China possuir um volume crescente de indústrias de metais não ferrosos, que têm sido apontadas como as principais fontes de poluição do solo por Cd (WEI et al., 2022). Além disso, a terra arável per capita é menos da metade da média mundial e considerando que em várias áreas agrícolas o limite tolerável de metais pesados é ultrapassado, medidas para controlar a poluição do solo têm sido uma prioridade do governo chinês, assim como métodos para controlar a poluição

burst elevado (88.11) entre 1993 e 2008. Esses dados fornecem à comunidade científica direcionamento para a divulgação de futuras pesquisas sobre a toxicidade do Cd, já que os periódicos com relevância no assunto possibilitam maior alcance e influência aos estudos.

3.3.1.4 Cocitação de Autores

A análise de cocitação mostra os autores mais mencionados em publicações sobre a toxicidade do Cd ao longo dos anos. Os cinco autores com maior número de citações nos trabalhos são Rainbow, PS. (349), Bradford, MM. (347), Viarengo, A. (298), Wang, WX. (286) e Roesijadi. G. (238). O autor Rainbow, PS., realizou um estudo analisando a taxa de absorção de metais traços (Zn, Ag, Cd) em crustáceos de locais costeiros da Grã-Bretanha e França (RAINBOW *et al.*, 1999). O autor Bradford, MM., desenvolveu um método para a quantificação de proteínas através da interação de aminoácidos com um corante, devido a isso possui elevado número de citações, já que análises enzimáticas são utilizadas para compreender o mecanismo fisiológico de organismos afetados por contaminantes. O autor Viarengo, A., realizou um trabalho juntamente com outros autores sobre o papel da metalotioneína no estresse oxidativo de uma espécie de mexilhão exposto ao Cd (VIARENGO *et al.*, 1999).

Um estudo de revisão sobre a interação de metais traços em cadeias alimentares marinhas pela biomagnificação foi realizado por Wang, WX., apresentando número elevado de citações. Assim como, o trabalho feito por Roesijadi. G., e colaboradores, onde também trabalharam com a metalotioneína avaliando sua expressão induzida por Cd no desenvolvimento larval de uma espécie de molusco (ROESIJADI *et al.*, 1995). Desta forma, é possível observar que os trabalhos realizados por esses autores foram de grande relevância e contribuição para o desenvolvimento de pesquisas sobre a toxicidade do Cd, servindo de embasamento intelectual e auxiliando no avanço científico do assunto.

3.3.1.5 Palavras-chave

As principais palavras-chave são apresentadas no gráfico 4A, em que a maior frequência de citação foi da palavra "Heavy metals" com 1133 citações, seguida da

A elevada frequência da palavra "Heavy metals" pode estar relacionada à crescente presença de metais pesados nos ambientes naturais, principalmente em ambientes aquáticos, associados aos sérios efeitos deletérios provocados tanto às espécies vegetais quanto animais, interferindo na produtividade agrícola, na biota, bioacumulando-se nos organismos e transferindo-se troficamente até chegar aos humanos (ELANGO *et al.*, 2022). A fins de esclarecimento, metais pesados são todos os metais ou metalóides (semi metais) que apresentam densidade da massa atômica acima de 5 g por centímetro cúbico (BARAKAT, 2011; GHUGE *et al.*, 2023).

O elevado destaque da palavra "Toxicity" deve-se aos danos provocados pela exposição a esses metais. Em animais e humanos essa exposição afeta severamente os órgãos e sistemas, como por exemplo, imunológico, circulatório e nervoso, desencadeia doenças renais, articulares, interfere no crescimento e no desenvolvimento cerebral, além disso, seus efeitos genotóxicos ainda favorecem o desenvolvimento de câncer (BARAKAT, 2011). A exposição a esses metais causa vários danos à saúde humana e animal, e o fato de serem bioacumulativos e comumente presentes nas águas superficiais, alimentos de origem animal e vegetal podem ter uma concentração de metais elevada, o que resulta em um grande problema ambiental e de saúde pública.

Com base nos dados apresentados acima verificamos que estudos com Cd são frequentemente associados a outros metais pesados (Cobre, Zinco e Chumbo). Existem alguns metais que em baixas concentrações são essenciais ao bom funcionamento dos organismos e plantas, mas que em doses elevadas podem produzir efeitos tóxicos. Por outro lado, existem os metais não essenciais, que são elementos persistentes, não biodegradáveis e altamente poluentes, que mesmo em baixas concentrações apresentam efeitos tóxicos significativos (KIRAN *et al.*, 2021).

Dentre os metais pesados não essenciais está o Cd, apresentandoum significativo efeito tóxico capaz de causar sérios danos à biota aquática. Os principais efeitos associados à exposição ao Cd são deformidades devido à inibição da absorção de cálcio (DUARTE *et al.*, 2020), alterações comportamentais, desordens no funcionamento de órgãos como rins e fígado, estresse oxidativo, danos ao DNA (KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021), efeitos neurotóxicos e ao sistema endócrino, além de reduzir a taxa de eclosão e aumentar a taxa de

mortalidade, interferindo assim na manutenção das espécies (ZHENG *et al.*, 2021) e, consequentemente resultando em declínios populacionais.

As palavras-chave foram agrupadas em um total de dezessete *clusters*. Cada cluster representa um conjunto de palavras-chave onde as cores expressam os agrupamentos de palavras e os *links* representam as coocorrências dos relacionamentos. Os *clusters* apresentaram modularidade de 0.775 e uma silhueta de 0.909, cujos valores correspondem à homogeneidade dos dados. Os *clusters* são ordenados de acordo com o volume de referências dos membros, por exemplo, o cluster #0 concentra as principais palavras-chave da área de pesquisa, seguido do cluster #1, #2 e assim por diante.

Observou-se que existe uma alta relação entre os *clusters*, com uma grande quantidade de *links* estabelecidos. Além disso, o *cluster* de palavras com maior destaque foi representado pelo #0 Oxidative stress com 32 termos incluídos, seguido pelo cluster #1 Risk assessment e #2 Heavy metals com 31 termos.

O estresse oxidativo é desencadeado por meio de alterações do metabolismo celular, em que o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é pró-oxidativo, favorecendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, as quais afetam o ciclo celular, as membranas e proteínas, podendo ocasionar morte das células (PAITHANKAR *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2022).

3.3.2 Toxicidade de Cádmio em organismos aquáticos fotossintetizantes

3.3.2.1 Características de publicação e impacto

O subconjunto de organismos aquáticos fotossintetizantes foi composto por 666 publicações, com o primeiro registro em 1978. O conjunto de dados tem um índice H de 71, com 23.636 citações e uma média de 35.49 citações por item. As pesquisas sobre a toxicidade do cádmio em organismos fotossintetizantes apresentaram um crescimento constante de publicações e citações nos últimos anos, principalmente a partir de 2004, com picos de crescimento em 2012 e entre 2018 a 2021, demonstrando ser um assunto atual e de grande interesse na comunidade científica. A queda do número de publicações e citações a partir de 2022, justifica-se pelo refinamento não compreender o ano completo.

As áreas de pesquisa que apresentaram maior destaque do conjunto de dados foram Ciências Ambientais e Ecologia (438), seguida de Toxicologia (224), Biologia Marinha de Água Doce (113), Ciências Vegetais (71), entre outras, indicando serem áreas bem influentes nas publicações do assunto. Por meio do programa Microsoft Excel 2016 foram extraídos mais dados, a fim de explorar de forma mais aprofundada os estudos que analisaram a toxicidade do Cd. As publicações que analisaram a toxicidade do Cd em organismos fotossintetizantes foram classificadas por tipo de estudo. A maioria das pesquisas foram realizadas em laboratório (71.0%), seguido de estudos em campo (15.6%), campo/laboratório (11.6%) e com menor ocorrência os de revisão (1.6%). As revisões bibliográficas não foram incluídas nas análises posteriores, pelo fato de compreenderem dados de estudos já abrangidos por outras publicações.

3.3.2.2 Organismos estudados

Os principais organismos, filos e espécies estudadas nos trabalhos que avaliaram a toxicidade do cádmio estão listados na tabela 2. Os grupos de organismos com maior ocorrência em publicações foram algas e angiospermas. Chlorophyta e Tracheophyta foram os filos que mais se destacaram, os quais abrangem as algas verdes e plantas vasculares, respectivamente. Foram estudadas 392 espécies diferentes. As espécies mais estudadas foram *Chlamydomonas reinhardtii* e *Lemna minor*.

A espécie mais estudada, *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga verde unicelular, possui elevada taxa de crescimento, alto poder de biorremediação e não apresenta efeitos tóxicos (ZHANG *et al.*, 2021), portanto é segura na recuperação de ambientes poluídos. Além disso, como é um produtor primário caracteriza-se por ser uma via de entrada do Cd para os níveis tróficos subsequentes (ZHANG *et al.*, 2023).

Essas características fazem com que seja um organismo bastante utilizado nos estudos da área. *Lemna minor* é uma macrófita aquática pertencente ao grupo das angiospermas e sua utilização vem crescendo no campo da fitorremediação, principalmente por apresentar desenvolvimento acelerado, e boa capacidade de remover e bioacumular metais (BEZERRA *et al.*, 2022). Dessa maneira, ambas as

espécies podem ser utilizadas tanto em estudos de fitorremediação quanto em estudos que avaliam a bioacumulação de Cd.

Tabela 2 - Organismos e espécies fotossintetizantes mais utilizados em estudos de toxicidade de Cd

FOTOSSINTETIZANTES					
Grupos mais estudados	Número de estudos	Filos mais estudados	Número de estudos	Espécies mais estudadas	Número de estudos
Algas	367	Tracheophyta	258	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48
Angiospermas	249	Chlorophyta	251	<i>Lemna minor</i>	42
Bactérias	32	Ochrophyta	88	<i>Chlorella vulgaris</i>	37
Pteridófitas	16	Rhodophyta	31	<i>Ceratophyllum demersum</i>	31
Briófitas	10	Cyanobacteria	25	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	27
Dinoflagelados	2	Bryophyta	9	<i>Eichhornia crassipes</i>	25
Cianobactérias	1	Haptista	9	<i>Pistia stratiotes</i>	18

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.2.3 Substâncias avaliadas

Durante a extração de dados das publicações, observou-se que muitas vezes foram analisadas outras substâncias juntamente com o Cd, portanto, foram agrupadas e identificadas as mais analisadas, bem como os principais tipos de elementos. Diversos metais pesados foram avaliados na maioria dos estudos (59.1%) e 32.6% dos trabalhos avaliaram o cádmio isoladamente. Na sequência, outras substâncias frequentemente estudadas, são os metais, pesticidas e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Dos elementos mais avaliados destacam-se os metais pesados Cobre, Zinco, Chumbo, Níquel, respectivamente (Tabela 3).

Os metais pesados são classificados em essenciais e não essenciais. Os essenciais, como por exemplo cobalto, cobre, manganês, níquel, zinco, etc., em concentrações adequadas são fundamentais para o bom funcionamento dos organismos, entretanto, em concentrações elevadas promovem efeitos tóxicos semelhante aos metais não essenciais, como por exemplo o Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Cromo, etc. (RAHMAN *et al.*, 2022). Esse fato pode explicar o grande volume de estudos que analisam vários metais pesados, pois a depender das concentrações, os efeitos tóxicos exercidos podem ser bastante semelhantes.

Tabela 3 - Principais substâncias e elementos avaliados em estudos de toxicidade de Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes

FOTOSSINTETIZANTES			
Principais substâncias avaliadas	Número de estudos	Principais elementos avaliados	Número de estudos
Metais pesados	396	Cobre	247
Apenas Cádmio	219	Zinco	203
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	12	Chumbo	196
Metais	11	Níquel	87
Herbicidas	8	Cromo	81
Pesticidas	8	Mercúrio	51
Microplásticos	6	Manganês	46
Minerais	6	Arsênico	44
Hormônios	2	Cobalto	34
Fármacos	2	Alumínio	24

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.2.4 Biomarcadores

Os principais biomarcadores utilizados nos estudos que avaliam a toxicidade do Cd em organismos fotossintetizantes estão listados na tabela 4. Houve uma grande diversidade de biomarcadores utilizados. Os biomarcadores mais frequentes nos estudos foram os que avaliaram a bioacumulação, seguido de crescimento, amplamente abordado no sentido de proliferação de algas principalmente.

O elevado volume de estudos que avaliam a bioacumulação de Cd pode ser justificado por ser um metal extremamente tóxico, bioacumulativo e não biodegradável, capaz de se acumular em plantas e organismos e chegar até ao homem por meio da transferência trófica. Além disso, um efeito provocado especificamente nesses organismos é a inibição da fotossíntese, principal característica desse grupo (SUHANI *et al.*, 2021). A interferência de Cd no crescimento de algas, afeta a manutenção das colônias (JIA; PAN; ZHU, 2023), o que pode comprometer toda uma cadeia alimentar, considerando que são organismos primários e que constituem a base da cadeia trófica.

Um parâmetro bioquímico comumente avaliado nos organismos fotossintetizantes é o teor de clorofila. O Cd prejudica a fixação de carbono e consequentemente os níveis de clorofila, o que ocasiona a redução da fotossíntese

comprometendo todo o ciclo de desenvolvimento (HAIDER *et al.*, 2021), ou seja, pode comprometer diversas funções fisiológicas.

Tabela 4 - Biomarcadores usados para avaliar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes

FOTOSSINTETIZANTES	
Biomarcadores	Número de estudos
Bioacumulação	300
Crescimento	239
Bioquímico	238
Fisiológico	134
Molecular	56
Morfológico	37
Biorremediação	28
Fitorremediação	23
Adsorção	15
Citotóxico	9
Biosorção	8
Germinação	7
Histológico	7
Genotóxico	6
Sobrevivência	6
Reprodução	3
Comportamental	2
Resistência	2
Riqueza de espécies	2
Deteção	1
Comunidade microbiana rizosférica	1
Liberação de esporos	1

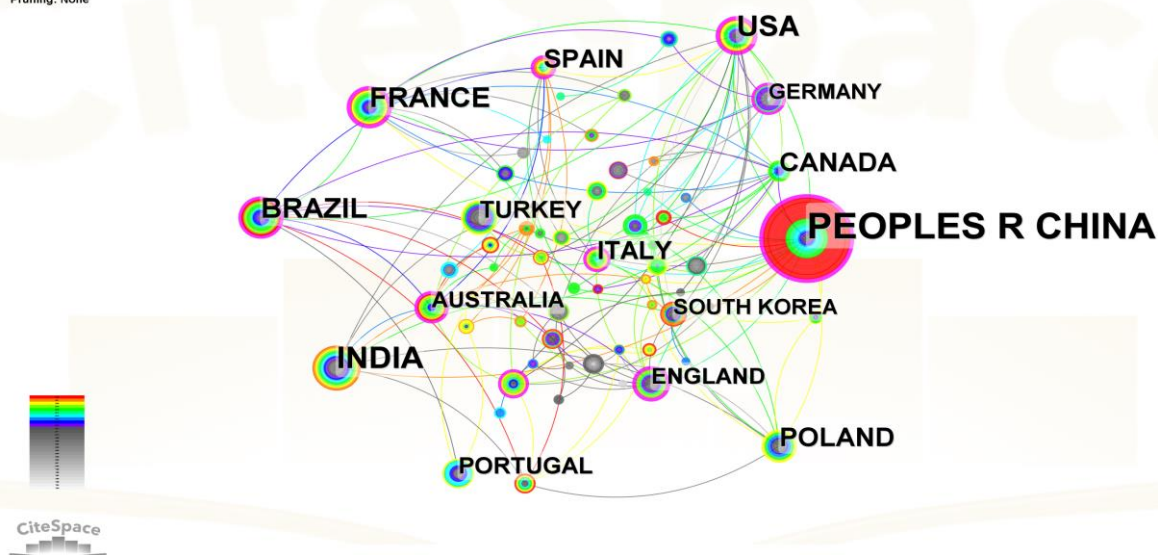
Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.2.5 Países

Em relação aos estudos que avaliam a toxicidade do Cd em organismos fotossintetizantes, o país que mais se destaca no número de publicações é China (147) com um *Burst* de 9.13 representado pelos anéis vermelhos (Gráfico 5), seguido de Índia (58), USA (46), Brasil (42) e França (42). De acordo com a centralidade (anéis roxos externos), os países mais influentes nesse assunto são USA com uma centralidade de 0.33, China (0.32) e França (0.31), ou seja, suas publicações exercem grande influência na área de pesquisa. A China por exemplo, possui grande número de publicações e grande influência no assunto, já a França apresenta um número menor de publicações, mas uma centralidade elevada, que denota sua importante influência nessa área de pesquisa.

Gráfico 5 - Redes da cooperação de países que mais contribuem com publicações de toxicidade de Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes

CiteSpace, v. 6.2.R2 (64-bit) Basic
 April 20, 2023 at 4:33:29 PM BRT
 WOS: C:\Users\Thais\Desktop\Algas cdmio\Dados
 Timespan: 1993-2022 (Slice Length=1)
 Selection Criteria: g-index (k=25), LRF=3.0, L/N=10, LBY=5, e=1.0
 Network: N=74, E=151 (Density=0.0559)
 Largest CC: 64 (86%)
 Nodes Labeled: 1.0%
 Pruning: None



Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.2.6 Palavras-chave

A rede de palavras-chave mais frequente nos artigos sobre toxicidade do Cd em organismos fotossintetizantes foram: “*heavy metal*”, “*toxicity*”, “*copper*”, “*accumulation*”, “*cadmium*” (Gráfico 6A) Essas palavras-chave já tiveram alta frequência ao analisar os dados gerais. No entanto, novas palavras aparecem vinculadas ao conjunto, como “*algae*”, “*plant*”, “*growth*”, *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii*, essas últimas referem-se ao grupo de organismo fotossintetizante mais utilizados e caracterizam-se por serem duas espécies modelo, com alta capacidade de remoção de nutrientes da água (LEE *et al.*, 2020). A palavra “*accumulation*” ganha destaque porque esses organismos são utilizados na biorremediação de locais poluídos com metais, devido a sua capacidade de reterem partículas metálicas (BWAPWA *et al.*, 2017).

Dentre as palavras-chaves mais frequentes foram determinadas as explosões de citações (*Bursts*) mais expressivas, a palavra “*phytoremediation*” apresentou maior destaque com um *burst* de 8.49, seguida das palavras: “*residual waters*” (5.44), “*phytoplankton*” (4.98), “*Cd*” (4.57), “*community*” (4.36), “*Zn*” (4.28), “*heavy metal*” (3.84) e “*Lemna minor*” (3.69). Os resultados reafirmam o que já vem sendo

apresentado, os artigos abordam o uso de algas e plantas aquáticas na avaliação dos efeitos tóxicos do Cd, isoladamente ou em combinação com outros metais, bem como o uso desses organismos na fitorremediação de locais poluídos por metais. A fitorremediação, além de ser de baixo custo, é muito eficaz para a melhoria da qualidade da água, removendo e degradando poluentes, incluindo metais pesados, por meio da adsorção por algas e plantas aquáticas (ALVAREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2019; MUSTAFA; HAYDER, 2021) e é, portanto, uma técnica muito promissora na área de pesquisa.

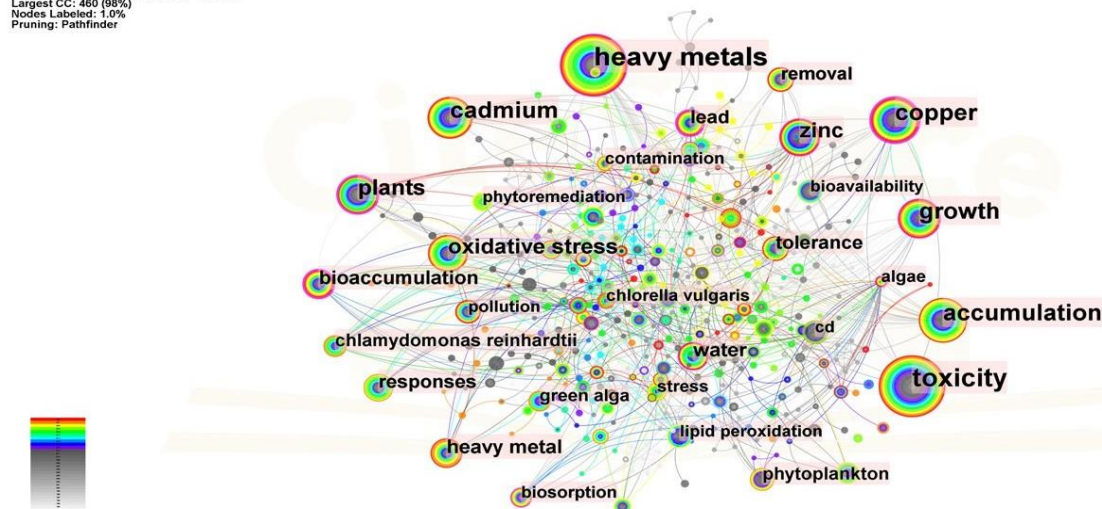
Pode-se ainda observar por meio dos *bursts*, que as palavras com maior predominância na atualidade são “residual waters” e “heavy metals”, indicando dessa forma que são assuntos pertinentes até o momento. A análise de *clusters* mostrou uma modularidade de 0.763 e uma silhueta de 0.9043. O *cluster* como maior volume de palavras é o #0 capacidade de adsorção, seguido do cluster #1 estresse oxidativo, #2 algas, #3 *Potamogeton crispus* e assim sucessivamente (Gráfico 6B).

A adsorção consiste na remoção de metais pesados da água por meio da utilização de materiais porosos orgânicos ou inorgânicos, a qual é bastante eficiente e econômica, principalmente no processo de tratamento das águas residuais (RAJENDRAN *et al.*, 2022). Com base nos resultados, estudos sobre a toxicidade do Cd frequentemente são associados a essa técnica de remoção, uma justificativa seria o fato das águas residuais, muitas vezes, apresentarem altos níveis de metais pesados, o que também explica as elevadas explosões de citações das palavras águas residuais e metais pesados.

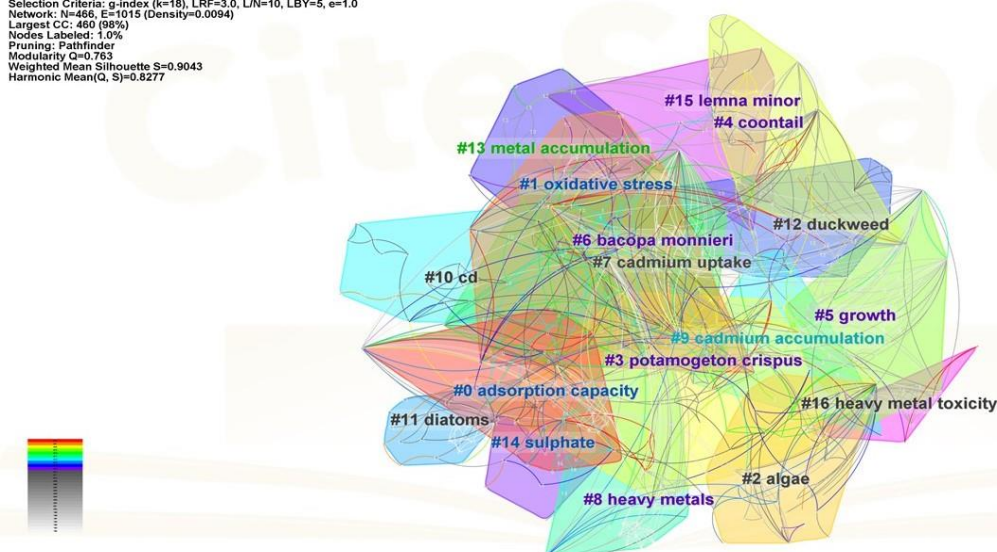
O volume de palavras incluídas no cluster #1 estresse oxidativo, pode ser explicado pelo fato de ser um efeito desencadeado pela exposição ao Cd, resultante de um desequilíbrio do sistema antioxidante onde há o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (CUYPERS *et al.*, 2023). *Potamogeton crispus* é uma espécie de macrófita submersa com ampla distribuição geográfica e elevada capacidade de remoção de metais (XU *et al.*, 2012), essas características favorecem sua utilização nos estudos, principalmente de fitorremediação, bioacumulação ou, a fim de realizar o biomonitoramento de determinada área.

Gráfico 6 - Rede de palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em fotossintetizantes

CiteSpace, v. 6.2.R2 (64-bit) Basic
 April 20, 2023 at 3:22:08 PM BRT
 WoS: C:\Users\Thais\Desktop\Algas cádmio\Dados
 Timespan: 1993-2022 (Slice Length=1)
 Selection Criteria: g-index (k=18), LRF=3.0, L/N=10, LBY=5, e=1.0
 Network: N=466, E=1015 (Density=0.0094)
 Largest CC: 460 (98%)
 Nodes Labeled: 1.0%
 Pruning: Pathfinder



April 20, 2023 at 3:22:08 PM BRT
 WoS: C:\Users\Thais\Desktop\Algas cádmio\Dados
 Timespan: 1993-2022 (Slice Length=1)
 Selection Criteria: g-index (k=18), LRF=3.0, L/N=10, LBY=5, e=1.0
 Network: N=466, E=1015 (Density=0.0094)
 Largest CC: 460 (98%)
 Nodes Labeled: 1.0%
 Pruning: Pathfinder
 Modularity Q=0.763
 Weighted Mean Silhouette S=0.9043
 Harmonic Mean(Q, S)=0.8277



A - Principais palavras-chave utilizadas em estudos sobre a toxicidade do Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes. B - Agrupamento das palavras-chave em clusters sobre a toxicidade do Cd em organismos aquáticos fotossintetizantes.

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.3 Toxicidade do cádmio em organismos aquáticos vertebrados

3.3.3.1 Características de publicação e impacto

O conjunto de dados composto por organismos aquáticos vertebrados incluiu 1626 publicações no período de 1974 a novembro de 2022. O subconjunto de dados

apresenta um índice H de 94, com um total de 51.347 citações e uma média anual de 31.66 citações por item. A partir de 2007 ocorreu um volume constante de publicações e um alto número de citações principalmente entre 2007 e 2017. A redução no número de publicações e citações em 2022 deve-se ao fato das publicações abrangerem somente até o início de novembro daquele ano.

Referente às áreas de pesquisas mais influentes sobre a toxicidade do Cd em organismos vertebrados destacam-se Ciência Ambiental e Tecnologia com 905 publicações, seguida de Toxicologia (645), Biologia Marinha de Água Doce (290), Bioquímica Biologia Molecular (180), Pescarias (162), Endocrinologia e Metabolismo (111) e outras com menor influência. Em relação aos tipos de estudos, em vertebrados aquáticos as pesquisas foram desenvolvidas predominantemente em laboratório (58.9%), seguido de estudos em campo (35.9%) e estudos de campo e laboratório em conjunto (3.64%)

Bioensaios laboratoriais ocorrem em um ambiente totalmente controlado, geralmente com utilização de organismos homogêneos e procedimentos padronizados. Um bioensaio objetiva reduzir ou anular interferências externas, além da variável independente que se deseja avaliar (FROUZ *et al.*, 2011). Ou seja, todos os efeitos serão provenientes exclusivamente da substância testada, porém, não reproduz as condições e características do ambiente natural.

Já em estudos de campo, ocorre a interferência de diversos parâmetros, substâncias e interações, há uma heterogeneidade alta dos organismos e algumas vezes as espécies estão adaptadas a determinada concentração ou substância avaliada (FROUZ *et al.*, 2011), pois há a ação de variáveis que não podem ser controladas.

Portanto, estudos realizados em laboratório possuem seus prós e contras, assim como os estudos de campo. Desse modo, o ideal seria realizar estudos de maneira combinada (campo e laboratório), o que de acordo com os dados é uma forma pouco explorada, entretanto, ressalta-se que tudo depende do objetivo que se deseja alcançar com determinada pesquisa.

3.3.3.2 Organismos estudados

A toxicidade do cádmio em vertebrados foi estudada em 859 diferentes espécies. Os grupos mais estudados são peixes, seguidos por mamíferos e anfíbios

(Tabela 5). *Danio rerio* é a espécie de peixe mais utilizada, seguida de *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss* e *Oreochromis niloticus* (Tabela 5). Essas espécies são altamente empregadas em estudos toxicológicos e também comercializadas para consumo humano (LINS *et al.*, 2010).

D. rerio (peixe zebra) é um organismo modelo, amplamente utilizado em bioensaios, pois se adapta bem em laboratório, se reproduz facilmente e de forma rápida, gerando grande volume de embriões e não demanda grandes espaços (ADHISH; MANJUBALA, 2023). Outro fator importante é que apresenta 70% de semelhança genética com humanos (HOWE *et al.*, 2013), sendo por isso muito utilizado para avaliar doenças humanas (ADHISH; MANJUBALA, 2023). Por esse motivo é tão utilizado nos estudos sobre a toxicidade do Cd, pois é possível estimar os efeitos provocados na saúde humana.

Os peixes foram estudados de maneira expressiva (92% dos trabalhos). Os peixes têm sido amplamente utilizados como bioindicadores em ensaios toxicológicos ou para a determinação de poluição por metais tóxicos, especialmente carnívoros e os detritívoros, por biomagnificarem poluentes e metais pesados, acumulando-os em órgãos e tecidos (DUARTE *et al.*, 2020; KOLAROVA; NAPIÓRKOWSKI, 2021) e por possuírem elevada sensibilidade à exposição a vários produtos químicos (GENTÈS *et al.*, 2019; HONG; ZHA, 2019; PRAGNYA *et al.*, 2021; TAKARINA *et al.*, 2021).

Tabela 5 - Organismos e espécies mais utilizados em estudos de toxicidade de Cádmio em vertebrados aquáticos

VERTEBRADOS			
Organismos mais estudados	Número de estudos	Espécies mais estudadas	Número de estudos
Peixes	1496	<i>Danio rerio</i>	176
Mamíferos	57	<i>Cyprinus carpio</i>	152
Anfíbios	30	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	144
Tubarões	15	<i>Oreochromis niloticus</i>	109

Tabela 5 - Organismos e espécies mais utilizados em estudos de toxicidade de Cádmio em vertebrados aquáticos (Continuação)

VERTEBRADOS			
Organismos mais estudados	Número de estudos	Espécies mais estudadas	Número de estudos
Aves	12	<i>Clarias gariepinus</i>	34
Répteis	12	<i>Sparus aurata</i>	31

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.3.3 Substâncias avaliadas

Os estudos, além de analisar a toxicidade do Cd de maneira isolada, também avaliaram, de forma simultânea, os efeitos de outras substâncias nos vertebrados (Tabela 6). Os estudos com outros metais pesados ultrapassam o número de publicações de estudos que analisaram isoladamente o Cd. Outras substâncias também são frequentemente analisadas como metais, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Dentre essas substâncias, os elementos mais presentes nos estudos foram cobre, zinco e chumbo. Essa situação pode estar associada ao fato de pertencerem à mesma classificação de elementos e possivelmente apresentarem efeitos muito semelhantes.

A avaliação conjunta com pesticidas pode ser explicada por serem amplamente utilizados na agricultura, possuir efeitos bioacumulativos, carcinogênicos e por comprometerem o sistema cardiovascular, reprodutivo e endócrino (SOUZA *et al.*, 2023), além de serem encontradas tanto nos solos quanto em ambientes aquáticos.

Os HPAs fazem parte dos contaminantes emergentes, os quais incluem diversas substâncias que vem apresentando uma utilização crescente, assim como sua presença em diversos ambientes naturais, onde encontram-se em concentrações cada vez mais elevadas, podendo provocar principalmente danos reprodutivos e endócrinos (PURI *et al.*, 2023). Os HPAs são substâncias persistentes, constituintes do petróleo e são liberadas no meio ambiente por meio da queima de combustíveis fósseis, alguns desses compostos também possuem efeitos carcinogênicos (TORRES *et al.*, 2008). Com base nos efeitos de ambas as substâncias podem haver declínio populacional das espécies por agir diretamente na reprodução.

Tabela 6 - Principais substâncias e elementos avaliados em estudos de toxicidade do Cd em vertebrados

VERTEBRADOS			
Substâncias mais avaliadas	Número de estudos	Elementos mais avaliados	Número de estudos
Metais pesados	890	Cobre	496
Apenas Cádmio	499	Zinco	474
Metais	108	Chumbo	463
Pesticidas	85	Mercúrio	212
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	37	Cromo	208
Minerais	31	Níquel	187
Bifenilos policlorados	25	Arsênio	168
Microplásticos	13	Ferro	122
Selênio	9	Manganês	100

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.3.4 Biomarcadores

O parâmetro mais analisado nas espécies estudadas é o biomonitor bioacumulação, presente em 890 estudos, seguido dos biomarcadores bioquímicos e moleculares, com 449 e 288 estudos, respectivamente (Tabela 7). Por meio dos biomarcadores é possível avaliar e mensurar as respostas de um organismo à determinada substância, ou seja, são os indicadores de toxicidade, os quais podem ser empregados em distintos níveis organizacionais (WATSON *et al.*, 2021), a fim de avaliar diferentes tipos de danos (GALLEGO-RÍOS *et al.*, 2021).

Tabela 7 - Biomarcadores usados para avaliar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos vertebrados

VERTEBRADOS	
Biomarcadores	Número de estudos
Bioacumulação	890
Bioquímico	449
Molecular	288
Sobrevivência	256
Fisiológico	198
Histológico	153
Desenvolvimento	149
Genotóxico	100
Morfológico	92
Comportamental	73
Reprodução	67
Hematológico	58
Imunológico	31
Citotóxico	23
Biorremediação	10
Fitorremediação	2

Fonte: Autoria própria (2023)

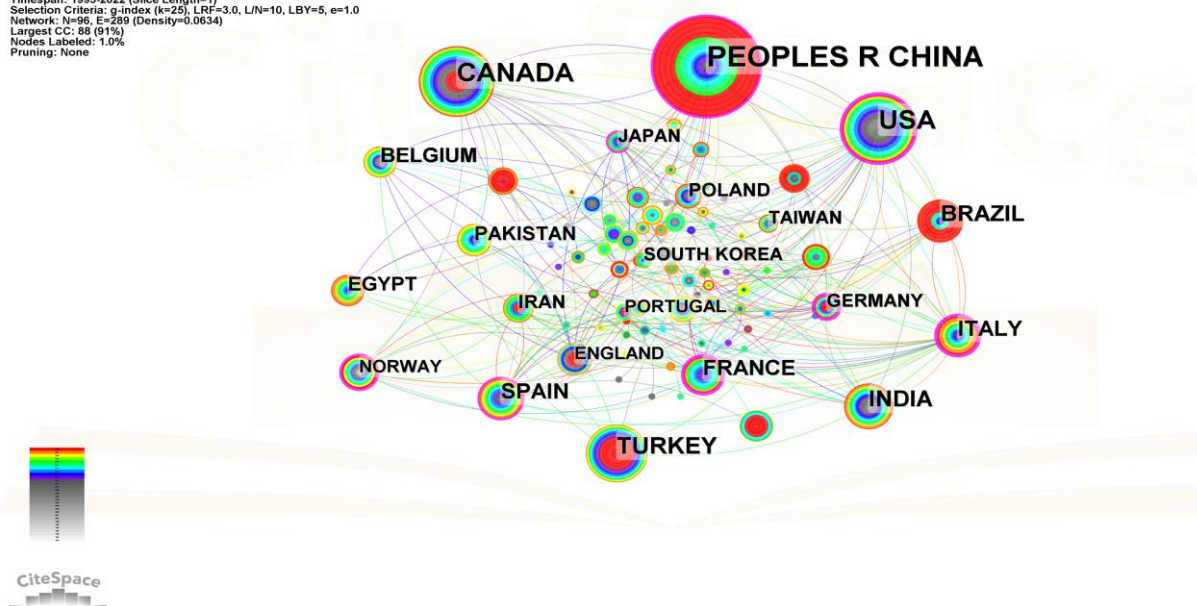
O fato de o Cádmio possuir efeitos bioacumulativos já registrados na literatura justifica a maioria dos estudos avaliarem a bioacumulação, além disso, o grande número de estudos realizados a campo que analisam esse biomarcador, indica o interesse em monitorar os ambientes naturais. O segundo biomarcador mais utilizado foi o bioquímico. Danos em nível bioquímico podem afetar o sistema antioxidante (TORRES *et al.*, 2008), bem como a atividade de neurotransmissores e, consequentemente provocar alterações comportamentais (HUSSAIN *et al.*, 2020).

3.3.3.5 Países

Entre os países com maior número de publicações de estudos sobre a toxicidade do Cd em organismos vertebrados, estão novamente a China com uma frequência de 283 estudos e um *burst* de 16.50, seguido de USA com a frequência de 171 estudos e um *burst* de 10.83 e Canadá com 169 publicações e um *burst* de 11.17. Ainda referente aos *bursts*, a Turquia também se destaca com 12.68, embora possua uma menor frequência de citações (98). Quanto à centralidade, que indica a influência que esses países exercem na área de pesquisa, a qual é representada pelos anéis roxos externos, os países que mais se destacam são a França com uma centralidade de 0.32, USA e Alemanha com 0.29 (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Redes da cooperação de países que mais contribuem com publicações de toxicidade de Cd em organismos aquáticos vertebrados

CiteSpace, v. 6.2.R2 (64-bit) Basic
April 24, 2023 at 9:36:43 AM BRT
WoS: C:\Users\Thais\Desktop\Cádmio citespace\Vertebrados\Dados
Timespan: 1993-2022 (Slice Length=1)
Selection Criteria: g-index (k=25), LRF=3.0, L/N=10, LBY=5, e=1.0
Network: N=96, E=289 (Density=0.0634)
Largest CC: 88 (91%)
Nodes Labeled: 1.0%
Pruning: None



Fonte: Autoria própria (2023)

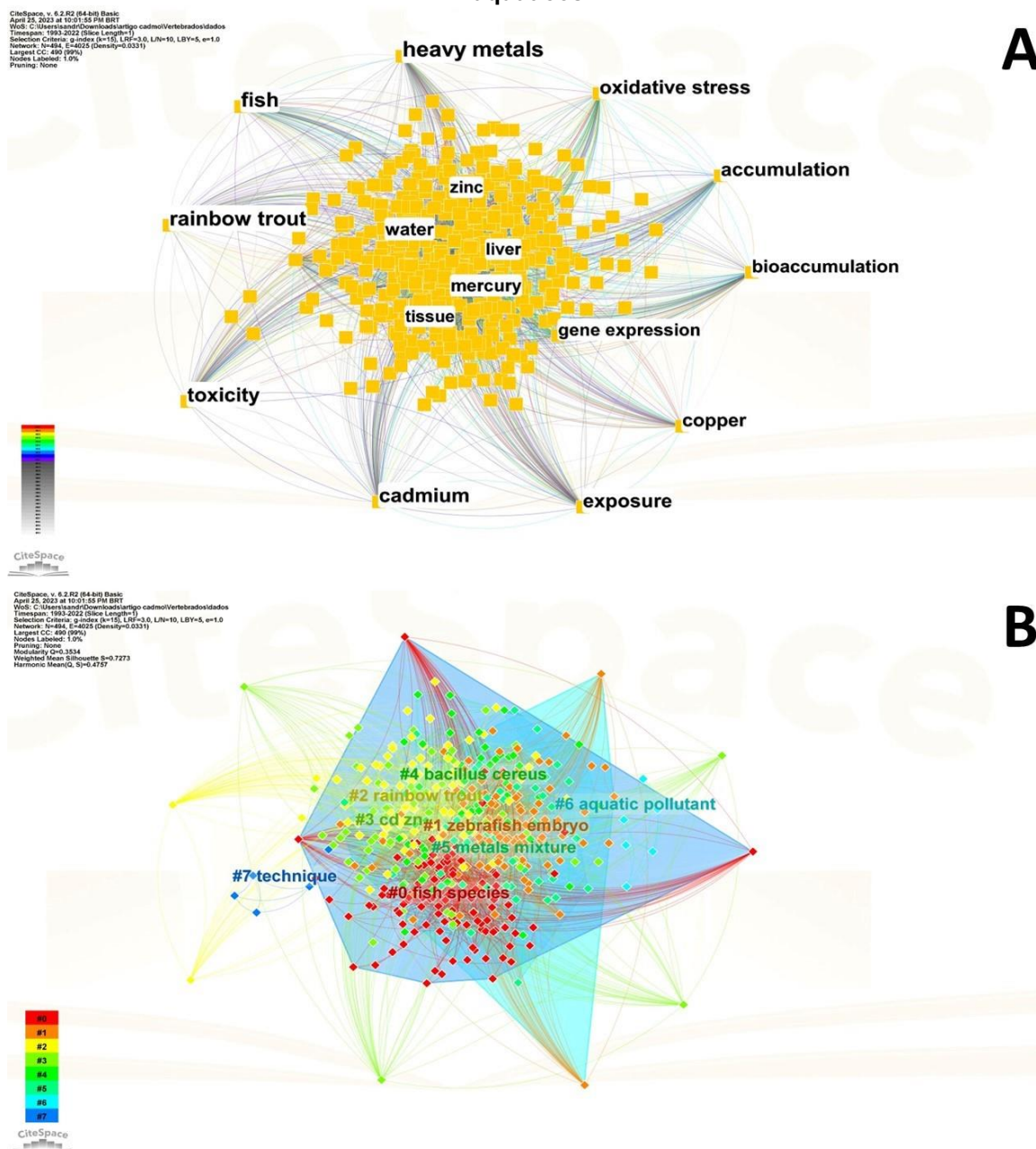
3.3.3.6 Palavras-chave

O Gráfico 8A mostra a rede de palavras-chave da pesquisa envolvendo vertebrados na avaliação da toxicidade do Cd. As palavras-chave utilizadas com maior frequência nos estudos são: “Metais pesados”, “Truta arco-íris”, “Peixe” e “Toxicidade”. Além destas, é possível observar a ocorrência de palavras representando outros metais pesados, assim como “expressão gênica”, uma análise bastante utilizada na avaliação de biomarcadores bioquímicos.

A análise das explosões de citações indicou que a palavra-chave “*Salmo gairdneri*” foi a que apresentou o maior *burst* (23.99), seguida de “*Oncorhynchus mykiss*” com um *burst* de 10.96, “elementos traço” (9.49) e “Truta arco-íris” (8.84). Dentre as palavras é possível identificar espécies comumente comercializadas para consumo humano (LINS *et al.*, 2010), sendo possível deduzir que muitos artigos abordam as questões de controle de metais em produtos da pesca para consumo humano e os efeitos toxicológicos adversos do Cd em várias espécies de peixes. Além dos impactos causados na biota aquática, o Cd também pode afetar a saúde humana, bioacumulando-se nos tecidos animais e entrando na cadeia alimentar. É um metal pesado que atinge níveis tróficos distintos, e que mesmo em pequenas concentrações desencadeia efeitos deletérios (REICHSTÄDTER *et al.*, 2020).

A análise de *clusters* de palavras-chave (agrupamento das palavras identificadas por distintas cores) apresentou uma modularidade de 0.3534 e uma silhueta de 0.7273. O *cluster* com maior número de palavras foi #0 espécies de peixes com 115 palavras, seguido do cluster #1 embrião de peixe zebra com 106 palavras, #2 truta arco-íris com 86, #3 Cd Zn (66), #4 *Bacillus cereus* (56), #5 mistura de metais (49), #6 poluente aquático (6) e #7 técnica (6) (Gráfico 8B). O resultado dos *clusters* corrobora com os resultados já apresentados na tabela 5, os quais foram obtidos e explorados por meio do programa Microsoft Excel. Por meio da análise dos *clusters* é possível deduzir que os peixes são organismos amplamente utilizados e que a espécie *D. rerio* é utilizado como um organismo modelo, frequentemente utilizado como verificado na tabela 5.

Gráfico 8 - Rede de palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em vertebrados aquáticos



A - Principais palavras-chave associadas aos estudos sobre a toxicidade do Cd em vertebrados aquáticos. B - Clusters de palavras-chave sobre a toxicidade do Cd em vertebrados aquáticos.

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.4 Toxicidade do cádmio em organismos aquáticos invertebrados

3.3.4.1 Características de publicação e impacto

A análise de organismos invertebrados incluiu 1.573 estudos, compreendendo o período de 1978 a novembro de 2022. O conjunto de estudos apresentou um índice H de 90 e 50.681 citações, resultando em uma média de 32.24 citações por

item. As publicações e citações aumentaram a partir de 2003. Em 2013 e 2017 ocorreram os maiores picos de publicações, ultrapassando 90 artigos em ambos os anos. Também é possível observar que nos últimos anos o número de citações ultrapassou o número de publicações sobre o assunto. A queda registrada em 2022 justifica-se pelas publicações compreenderem até o início de novembro de 2022, não incluindo dados do ano completo.

Das áreas de pesquisas mais influentes, Ciências Ambientais e Tecnologia foi a que mais se destacou com um volume de 1.074 publicações, Toxicologia aparece na sequência com 699 estudos e Biologia Marinha de Água Doce com 345 estudos. Como pode ser observado, as áreas de pesquisas não diferiram muito entre os conjuntos de dados, aparecendo em evidência em mais de um grupo analisado, como por exemplo Toxicologia, Biologia Marinha de Água Doce e Ciências Ambientais e Tecnologia, indicando que estas áreas englobam todos os organismos com foco na avaliação da toxicidade de metais.

Em invertebrados aquáticos foram realizados diferentes tipos de pesquisas. Assim como nos outros grupos, os estudos realizados em laboratório predominaram (60.3%), seguido por estudos em campo (26.0%) e pesquisas realizadas em campo e laboratório (10.6%). As revisões também estavam presentes em menor quantidade (2.8%).

Estudos em laboratórios possibilitam maior controle das variáveis e estudo do Cd na forma isolada e em várias concentrações, já os estudos em campo possuem múltiplos fatores que podem influenciar na toxicidade do Cd, dificultando a relação do Cd com as alterações presentes no organismo avaliado, porém, são de grande importância para a avaliação do risco ambiental e a saúde humana (GHOSH *et al.*, 2018). Em laboratório é possível compreender melhor como ocorrem os processos biológicos após a exposição ao Cd e quais órgãos acumulam mais metal (GUI *et al.*, 2022). Desta forma, a combinação de estudo em laboratório e campo é recomendada, apesar de consistir em uma abordagem pouco utilizada. Desse modo, a combinação de estudos de campo e laboratório podem ser o foco dos próximos estudos, com a integração das informações, bem como a síntese e compilação de resultados obtido por revisões.

3.3.4.2 Organismos estudados

A avaliação das espécies de invertebrados mais utilizadas em estudos de toxicidade do Cd indicou que *Daphnia magna* é a principal espécie utilizada, estando presente em mais de 150 pesquisas, em seguida destacam-se *Mytilus galloprovincialis* e *Chironomus riparius*, (Tabela 7), ou seja, além do microcrustáceo *Daphnia magna* são utilizados principalmente moluscos bivalves. Ao todo 1.046 espécies de invertebrados aquáticos foram estudadas.

D. magna é um organismo modelo tradicionalmente estudado. É um crustáceo planctônico de ampla distribuição geográfica com ciclo de vida partenogenético cíclico. *D. magna* é empregada em ensaios ecotoxicológicos com o objetivo de examinar os efeitos potencialmente tóxicos de compostos químicos na sobrevivência e reprodução (EBERT, 2022) e para o monitoramento de toxicidade de efluentes e poluição ambiental (PERSOONE *et al.*, 2009). A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) possui diretrizes para teste de imobilização aguda e teste de reprodução com *D. magna*, a fim de produzir curvas dose-resposta e estabelecer parâmetros sobre o potencial tóxico de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente (OECD, 2004; OECD, 2012).

C. riparius é um inseto Chironomidae frequentemente analisado em estudos ecotoxicológicos, usando suas larvas para monitorar a poluição e o impacto nos ecossistemas fluviais e avaliar a eficácia de medidas de recuperação desses ecossistemas (FARIA *et al.*, 2008). As demais espécies apresentadas com maior frequência são moluscos bivalves utilizados em biomonitoramento, principalmente de metais, por serem organismos filtradores podem acumular esses metais com maior facilidade (ZUYKOV; PELLETIER; HARPER, 2013).

Por meio da classificação das espécies por grupo animal (Tabela 7) foi possível constatar que o grupo mais estudado é o dos moluscos, o qual ultrapassa o volume de 650 publicações, logo em seguida destaca-se o grupo dos crustáceos com mais de 600 estudos. Os demais organismos apresentam uma frequência menor, é o caso dos insetos, seguido dos anelídeos, nematódeos e rotíferos. A maior frequência de moluscos e crustáceos está relacionada ao maior uso de espécies destes grupos na avaliação da toxicidade do Cd e esses grupos possuem uma maior atenção sobre estudos de metais, pois englobam muitas espécies consumidas por seres humanos (AYANDA *et al.*, 2020).

Tabela 8 - Organismos e espécies mais utilizados em estudos de toxicidade de Cd em invertebrados aquáticos

INVERTEBRADOS			
Organismos mais estudados	Número de estudos	Espécies mais estudadas	Número de estudos
Moluscos	713	<i>Daphnia magna</i>	157
Crustáceos	656	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	87
Insetos	182	<i>Chironomus riparius</i>	51
Anelídeos	99	<i>Crassostrea gigas</i>	42
Equinodermos	32	<i>Perna viridis</i>	34
Rotíferos	22	<i>Crassostrea virginica</i>	32
Nematóides	21	<i>Mytilus edulis</i>	31

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.4.3 Substâncias avaliadas

A identificação e agrupamento das substâncias testadas (Tabela 8) indicou que predominantemente são avaliados outros metais pesados em combinação com o Cádmio, os quais ultrapassam 1.000 estudos. Já as pesquisas que avaliam a toxicidade somente do Cd apresentam uma frequência de pouco mais de 400 estudos. Outras substâncias estudadas, mas em proporção bem inferior são os HPAs, pesticidas, bifenilos policlorados e nanopartículas. Entre os elementos mais estudados destacam-se cobre, zinco e chumbo. Portanto observa-se que os principais elementos testados em estudos de toxicidade são metais pesados.

No ambiente natural é impossível encontrar apenas o Cd, ele sempre está associado a outros metais e outros poluentes, desta forma os estudos apresentam esta combinação. Os metais que se destacaram na análise são decorrentes principalmente da mineração, mas atividades industriais e agrícolas contribuem para uma elevada concentração de metais nos ambientes aquáticos (SELVI; HUSSAIN, 2022). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são o segundo grupo de contaminantes associados ao Cd e esses compostos orgânicos hidrofóbicos possuem fontes de processos naturais como incêndios florestais e vazamento de óleo e principalmente de fontes antropogênicas como a combustão incompleta de combustíveis fósseis, lodo de esgoto e derramamento de óleo (LAWAL, 2017) e compreendem compostos altamente tóxicos.

Tabela 9. Principais substâncias e elementos avaliados em estudos de toxicidade de Cd em invertebrados aquáticos

INVERTEBRADOS			
Substâncias mais avaliadas	Número de estudos	Elementos mais avaliados	Número de estudos
Metais pesados	1004	Cobre	656
Cádmio isolado	449	Zinco	641
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	56	Chumbo	539
Pesticidas	46	Níquel	278
Bifenilos policlorados	22	Cromo	258
Nanopartículas	21	Mercúrio	229
Compostos químicos	9	Arsênico	188
Microplásticos	8	Ferro	149
Contaminantes orgânicos	7	Manganês	142

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.4.4 Biomarcadores

A análise dos biomarcadores indicou que o mais utilizado em estudos que avaliam a toxicidade do Cádmio em invertebrados aquáticos é o biomonitor bioacumulação, presente em mais de 750 estudos. Sobrevivência e os biomarcadores bioquímicos aparecem em seguida (Tabela 10). Como observado na análise dos organismos fotossintetizantes e dos vertebrados, bioacumulação se destaca pelas propriedades do Cd de bioacumular nos tecidos animais e vegetais.

Tabela 10 - Biomarcadores usados para avaliar a toxicidade de Cd em organismos aquáticos invertebrados

INVERTEBRADOS	
Biomarcadores	Número de estudos
Bioacumulação	774
Sobrevivência	429
Bioquímico	405
Molecular	214
Fisiológico	162
Desenvolvimento	153
Reprodução	144
Comportamental	92
Genotóxico	65
Histológico	58
Imunológico	55
Morfológico	47
Celular	41
Populacional	10
Biorremediação	9
Hematológico	7
Endócrino	1

Fonte: Autoria própria (2023)

Biomarcadores de sobrevivência são comumente empregados em testes toxicológicos de qualquer composto, a fim de identificar a concentração ou dose letal e fazem parte das Diretrizes da OCDE para produtos químicos (OECD, 1992). Biomarcadores bioquímicos englobam diversas moléculas e enzimas que atuam na detoxificação do organismo exposto ao Cd, são biomarcadores de resposta rápida e representam um efeito subletal, que embora não provoque a morte, provoca danos que afetam processos fisiológicos dos organismos (ABARIKWU *et al.*, 2017).

3.3.4.5 Países

Para os dados dos organismos aquáticos invertebrados o CiteSpace indicou que assim como nos demais grupos de organismos, a República Popular da China é o país que mais se destaca na frequência de citações (Gráfico 9). Esse país apresenta um total de 285 estudos e um *burst* de 17.43 indicado pelos anéis vermelhos na figura. É um *burst* bastante elevado comparando-se aos demais países, como Canadá, o segundo classificado nas explosões de citações o qual apresenta um *burst* de 8.67.

Na sequência destacam-se novamente USA com 194 estudos e um *burst* de 8.49 e França com 145 publicações, que além de contribuir substancialmente com o número de estudos, embora não possua um *burst* elevado, apresenta a maior influência na área de pesquisa com uma centralidade de 0.31. Outros países bastantes influentes são Itália e Alemanha com centralidade de 0.24 e Inglaterra com centralidade de 0.20, as quais são representadas pelos anéis externos roxos.

3.3.4.6 Palavras-chave

A análise de palavras-chave indicou que as palavras mais frequentes para invertebrados foram “metais pesados”, “toxicidade”, “Cádmio”, “Cobre”, “estresse oxidativo”, “Zinco”, “acumulação”, “bioacumulação”, entre outras (Gráfico 9A). Essas palavras-chave já apresentaram alta frequência ao analisar os dados gerais.

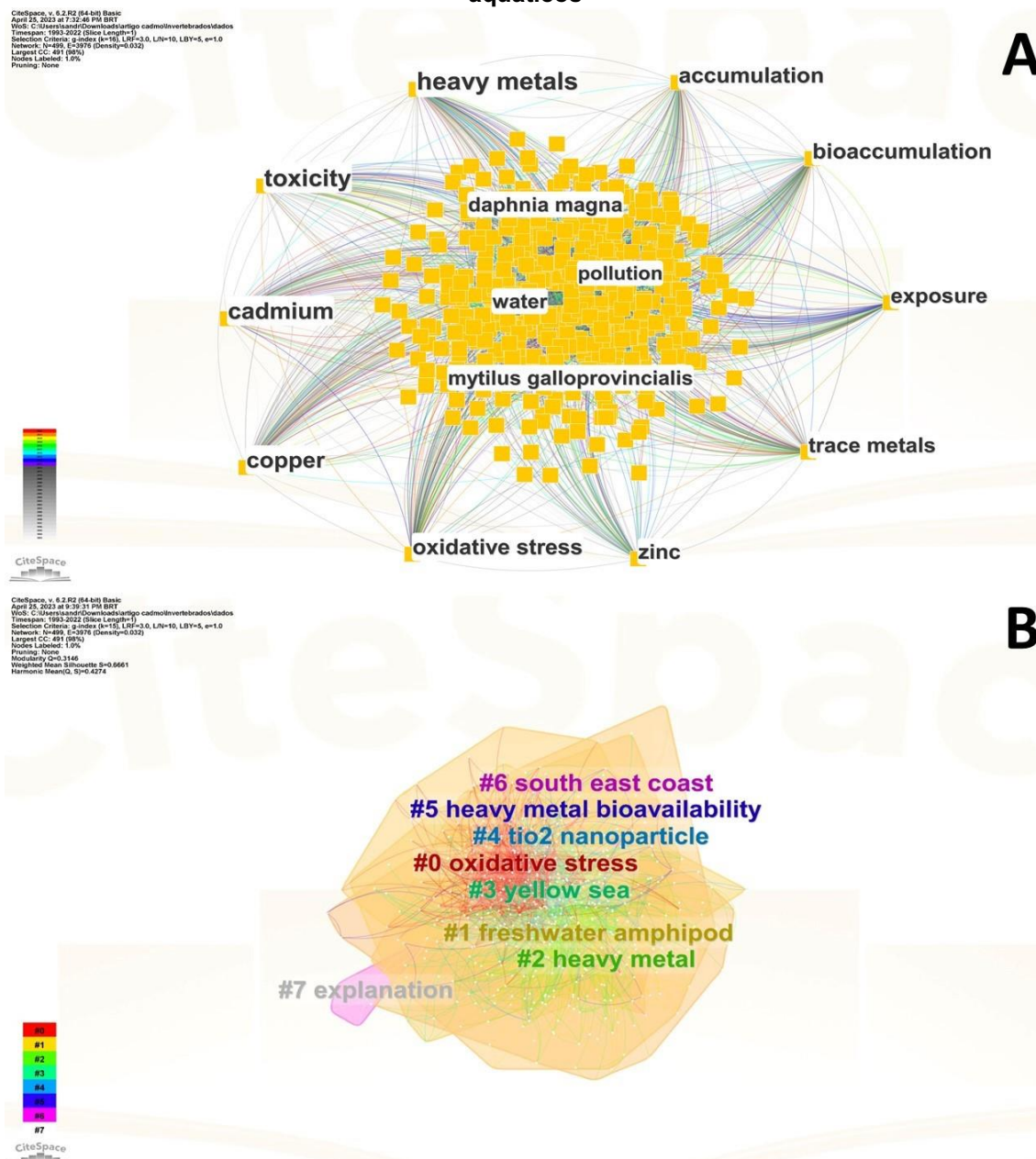
Também aparecem algumas palavras mais relacionadas aos invertebrados como *Daphnia magna* e *Mytilus galloprovincialis* que são nomes científicos de espécies de invertebrados utilizadas em testes toxicológicos (NASSER; LYNCH, 2019). *Daphnia magna*, por exemplo, é um microcrustáceo amplamente empregado

em bioensaios devido ao seu rápido desenvolvimento, alta reprodução e sensibilidade à presença de poluentes (NAGEL *et al.*, 2021). As palavras-chaves mais citadas estão diretamente relacionadas às análises de frequência já apresentadas, como os biomarcadores, metais e espécies mais utilizadas nos estudos da toxicidade do Cd em invertebrados aquáticos.

“Cobre” foi a palavra-chave com o maior *burst* (8.94), seguida de “truta arco-íris” (7.98), “peroxidação lipídica” (6.98) e “metais” (6.94). Portanto, por meio dessas palavras pode-se deduzir que os estudos que utilizam invertebrados comumente analisam outros organismos etambém outros metais.

A análise de *clusters* (Gráfico 9B) apresentou uma silhueta de 0.67 e uma modularidade de 0.31. Os *clusters* que apresentaram a maior frequência de um agrupamento de palavras-chave foram #0 estresse oxidativo com 129 palavras, #1 anfípode de água doce (98), #2 metal pesado (93), #3mar amarelo (83), #4 nanopartículas de dióxido de titânio (42), #5 biodisponibilidade de metais pesados (27), #6 costa sudeste (15) e #7 explicação (4). O maior *cluster* foi #0 estresse oxidativo, que está relacionado à biomarcadores bioquímicos, já apresentado como um dos mais frequentes, assim como o *cluster* #1 que engloba citações sobre anfípode, um organismo pertencente ao grupo crustáceo, com alta frequência nos estudos.

Gráfico 9 - Rede de palavras-chave mais influentes sobre a toxicidade de Cd em invertebrados aquáticos



A - Rede de palavras-chaves mais utilizadas em estudos sobre a toxicidade do Cd em invertebrados aquáticos. B - Clusters de palavras-chave sobre a toxicidade do Cd em invertebrados aquáticos
 Fonte: Autoria própria (2023)

3.4 Conclusão

O presente estudo apresentou uma abrangente revisão sobre pesquisas da toxicidade do Cádmio em organismos aquáticos, explorando de forma detalhada os organismos fotossintetizantes, animais vertebrados e invertebrados. Com base nos resultados pode-se constatar que os organismos mais estudados são os vertebrados

e invertebrados, os quais são consumidos pelo homem e podem transferir os metais acumulados em seus tecidos. O uso de algas vem ganhando espaço aos poucos e pode indicar o direcionamento de pesquisas futuras, bem como estudos de biorremediação de águas poluídas.

Durante a análise dos dados foram encontradas algumas limitações; alguns estudos não apresentaram todas as informações ou as apresentavam parcialmente, como nome das espécies utilizadas e tipos de elementos avaliados. Essa situação dificulta o processo de exploração dos dados e obtenção de resultados, portanto, deve ser superada em estudos futuros.

O crescente número de publicações e os diferentes bioindicadores utilizados evidenciam a preocupação da comunidade científica com as consequências da contaminação por metais pesados. Atualmente, os esforços estão aplicados em estudos que buscam avaliar a toxicidade causada por Cd, principalmente por meio da análise do estresse oxidativo e bioacumulação. Para o direcionamento de pesquisas futuras há a necessidade de métodos eficientes de degradação ou imobilização do Cd em ambientes aquáticos, a fim de remediar o impacto desse metal no ecossistema.

4 CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS DE CÁDMIO E SEUS POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS SOBRE *Allium cepa* L.

4.1 Introdução

Concentrações elevadas de metais pesados estão cada vez mais presentes nos ambientes naturais devido às atividades industriais, de mineração e agropecuárias, representando um sério problema aos organismos expostos devido aos potenciais efeitos tóxicos e bioacumulativos (JAYAWARDENA; WICKRAMASINGHE; UDAGAMA, 2021; ULLAH; MUHAMMAD, 2020).

Essas crescentes concentrações de metais são provenientes, principalmente, de fontes antropogênicas de contaminação, que acabam sendo transportadas e depositadas nos ambientes aquáticos, degradando a qualidade de sua água. Em torno de 40% dos rios e lagos de todo o mundo já foram contaminados com metais pesados e, na América do Sul, as formas de contaminação (93,5%) ocorrem por meio do uso de fertilizantes e pesticidas em áreas agrícolas, descarte indevido de resíduos, mineração e produtos e processos industriais (ZHOU *et al.*, 2020).

O cádmio (Cd) é um dos metais pesados mais tóxicos que existe, com capacidade de atingir organismos de diferentes níveis tróficos (biomagnificação), oferecendo um sério risco à saúde pública através da contaminação de plantas e animais comercializados ou coletados para consumo (SODHI *et al.*, 2022). Além disso, sua concentração é crescente e tem sido detectada em níveis muito superiores aos permitidos em mananciais superficiais em todo o mundo, tornando a água não segura para abastecimento (KADIM; RISJANI, 2022). Essa situação é bastante preocupante considerando sua elevada toxicidade mesmo em baixas concentrações (KIRAN; BHARTI; SHARMA, 2022), uma vez que esse oligoelemento não é biodegradável (ZAMORA-LEDEZMA *et al.*, 2021) e provoca inúmeros efeitos tóxicos à biota, dentre os quais podemos citar estresse oxidativo, mutações e danos reprodutivos (KAKADE *et al.*, 2023).

Para avaliar a toxicidade de substâncias como o Cd, as plantas são amplamente utilizadas em bioensaios, uma vez que permitem avaliar a incorporação desses elementos em sua biomassa e detectar as disfunções biológicas por meio de parâmetros citogenotóxicos, fitotóxicos e mutagênicos. As plantas são sensíveis a diversos poluentes e apresentam resultados confiáveis e de baixo custo. Em geral,

são realizados de forma complementar à detecção de compostos químicos (BHAT *et al.*, 2019). Ademais, das plantas superiores utilizadas no biomonitoramento ambiental, a espécie *Allium cepa* se destaca pela ampla aceitação e utilização em bioensaios controlados, se tornando um protocolo de referência para avaliação da ecotoxicidade de substâncias químicas diversas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

Considerando a importância em investigar as respostas da exposição à concentrações de Cd, o presente estudo buscou analisar se concentrações realísticas desse metal são capazes de se incorporar na biomassa e promover danos fitotóxicos e citogenotóxicos em *A. cepa*.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Produto e concentrações

O produto utilizado para preparar as soluções-teste foi cloreto de cádmio monohidratado ($\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$), grau P.A, de peso molecular de $201.33 \text{ g mol}^{-1}$, o qual foi diluído em água ultrapura, a fim de extinguir o efeito da presença de quaisquer outras substâncias, nas concentrações de 5, 50 e $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Foi utilizado um controle negativo apenas com água ultrapura e um controle positivo com metil metanosulfonato (MMS) a 10 mg L^{-1} . MMS é utilizado como controle positivo por apresentar conhecida ação mutagênica e carcinogênica (DONOVAN; SMITH, 2010), provocando danos e impedindo a replicação do DNA por meio da modificação da adenina e guanina (LUNDIN *et al.*, 2005).

A menor concentração de Cd ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) foi estabelecida com base no que estava preconizado na Portaria GM/MS nº 05/2017 que, recentemente, foi alterada pela Portaria GM/MS nº 888/2021, reduzindo para $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ o limite máximo em água para o consumo humano oriundas de Estações de Tratamento. Contudo, a concentração de $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ é adotada pela Agência Norte Americana de Proteção Ambiental (USEPA) nos seus padrões de potabilidade, sendo também o limite permitido pela Resolução CONAMA nº 396/2008 para o uso de águas subterrâneas para o abastecimento ou recreação.

A concentração de $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foi determinada por representar um valor realístico encontrado atualmente em águas doces de rios e lagos do mundo. Em países com atividades agrícolas intensivas, como na América do Sul, a

concentração média de Cd em ambientes fluviais e lacustres alcança cerca de $65 \mu\text{g L}^{-1}$ (ZHOU *et al.*, 2020). Já a concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ foi estabelecida considerando uma perspectiva de aumento no futuro (valor 10 vezes maior ao registrado em rios atualmente), tendo em vista que da década de 70 até os dias atuais a concentração de Cd já aumentou cerca de 30 vezes (ZHOU *et al.*, 2020).

4.2.2 Preparo da solução de Cádmio

As soluções de Cd foram preparadas a partir da dissolução de cloreto de cádmio monohidratado ($\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$) em água ultrapura. Considerando que foram testadas concentrações extremamente baixas de Cd, inicialmente se fez o preparo de uma solução estoque de $50.000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd.

A solução estoque ($50.000 \mu\text{g L}^{-1}$) foi preparada adicionando 0.009 g do cloreto de cádmio monohidratado ($\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$) em 100 ml de água ultrapura. A partir disso, prepararam-se as concentrações pré-determinadas: I) $500 \mu\text{g L}^{-1}$ foi obtida por meio da dissolução de 1 ml (1000 μl) da solução estoque em 100 ml de água ultrapura; II) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ foi obtida pela dissolução de 0,1 ml (100 μl) da solução estoque em 100 ml de água ultrapura; III) a menor concentração testada foi preparada pela pipetagem de 0,1 ml (100 μl) da solução estoque em 1000 ml de água ultrapura.

Como foram testadas concentrações muito baixas de Cd, foram tomadas algumas precauções para não haver interferências e comprometer a confiabilidade dos resultados. Todas as vidrarias utilizadas no decorrer do ensaio foram lavadas e esterilizadas com solução de ácido nítrico (HNO_3) a 5%, a fim de eliminar a presença de quaisquer outras substâncias que poderiam estar aderidas às vidrarias.

4.2.3 Espécie modelo

A espécie *Allium cepa* foi selecionada como modelo biológico para o desenvolvimento do presente estudo por se tratar de uma espécie vegetal amplamente utilizada em bioensaios que buscam avaliar genotoxicidade e alterações mutagênicas, pois possui grandes e poucos cromossomos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA *et al.*, 2009), possibilitando a determinação do índice mitótico e a identificação da incidência de aberrações cromossômicas. Além

disso, comumente é utilizada para analisar parâmetros fitotóxicos, principalmente germinação e desenvolvimento radicular. A possibilidade de realizar essas análises, aliada a confiabilidade, precisão, logística e baixo custo do bioensaio (BHAT *et al.*, 2019), justificam a utilização dessa espécie no estudo.

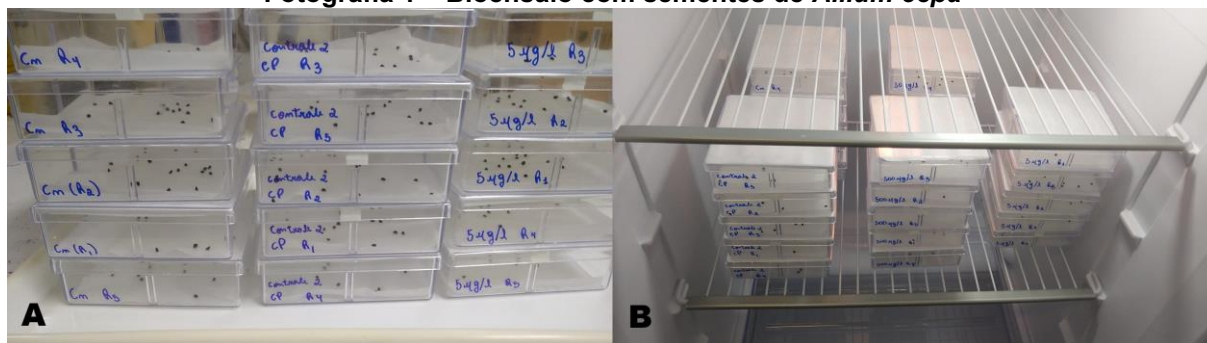
Esse bioensaio foi desenvolvido e empregado pela primeira vez em 1938 por Levan para análise mitótica e, posteriormente foi modificado por Fiskesjö (1985) para avaliar genotoxicidade por meio de análise de aberrações cromossômicas e alterações mutagênicas por meio da identificação de micronúcleos, a fim de realizar o monitoramento ambiental de efluentes e resíduos industriais (BHAT *et al.*, 2019; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esse mesmo autor (Fiskesjö) demonstrou que o teste apresenta sensibilidade aproximada ao sistema de teste de linfócitos humanos e ao teste de algas (SOUZA *et al.*, 2009), sendo a partir de então muito usual em ensaios de ecotoxicidade no mundo todo.

4.2.4 Bioensaio

O ensaio foi conduzido em abril de 2022 no laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Em caixas Gerbox, foram distribuídas 25 sementes/caixa de *A. cepa* cv. Baia Periforme (Isla®), sem adição de produtos químicos no envase a fim de evitar interferências nos resultados. Os recipientes foram forrados com duas camadas de papel germitest no fundo e uma camada na tampa, sendo realizadas 5 repetições por tratamento (quintuplicata) (Fotografia 1 A).

A metodologia de incubação utilizada foi inspirada e adaptada do procedimento proposto por Fiskesjö (1985) e Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007). As soluções-teste (grupos) foram pipetadas em volume de 2,5 vezes o peso das camadas do papel das caixas (RAS, 2009), sendo posteriormente incubadas a 20 °C em estufa B.O.D, com fotoperíodo (12/12h) durante 240h (Fotografia 1 B).

Fotografia 1 – Bioensaio com sementes de *Allium cepa*



A) Disposição das sementes de *A. cepa* em caixas Gerbox foradas com papel germitest. B) Distribuição das caixas no interior da incubadora B.O.D

Fonte: Autoria própria (2023)

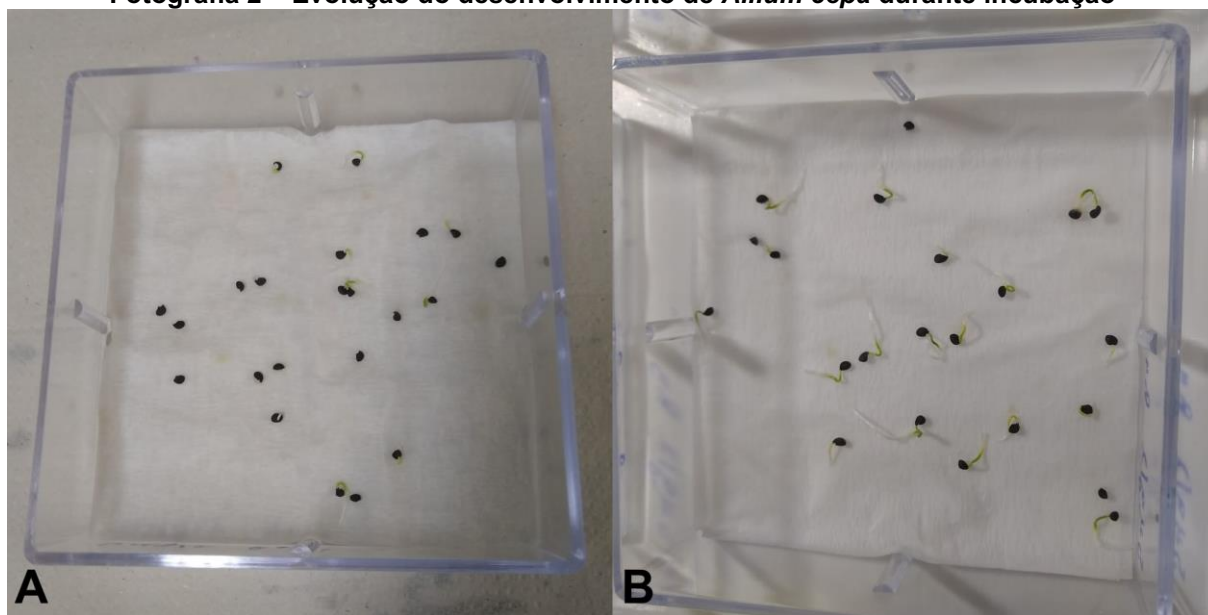
Conforme já apresentado, os tratamentos foram compostos por distintas concentrações de Cd (5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) e para fins comparativos e validação do bioensaio foi utilizado tanto um controle negativo (água ultrapura) quanto um controle positivo (MMS a 10 mg L^{-1}). A fim de manter a umidade e as condições adequadas para o desenvolvimento radicular essas soluções foram repostas quando observada a necessidade.

4.2.5 Parâmetros fitotóxicos

Após exposição e incubação foram analisados os parâmetros fitotóxicos de germinação e crescimento radicular. Transcorridas 72h após exposição das sementes às soluções teste, iniciou-se a avaliação da germinação, a qual foi realizada a cada 24h por meio da contagem das sementes que apresentavam protusão da radícula com tamanho mínimo de 2 mm. A contagem da germinação foi finalizada após completar 192h de exposição.

O bioensaio foi encerrado após 240h de incubação, com isso foi realizada a avaliação do crescimento radicular, onde foram selecionadas aleatoriamente 5 plântulas de cada caixa de germinação, as quais foram medidas (em mm) com o auxílio de um paquímetro digital. A evolução da germinação e desenvolvimento radicular pode ser observada na Fotografia 2 A-B.

Fotografia 2 – Evolução do desenvolvimento de *Allium cepa* durante incubação



A) Sementes de *Allium cepa* na fase inicial da germinação. B) Desenvolvimento radicular durante incubação

Fonte: Autoria própria (2023)

4.2.6 Parâmetros citogenotóxicos

Foram realizadas análises citogenotóxicas com base nos procedimentos descritos por Guerra e Souza (2002). Essas análises consistiram na avaliação das fases do ciclo celular por meio da determinação do índice mitótico (IM) e da determinação do índice de aberrações cromossômicas (IAC)

Após 96h de incubação foram coletadas aleatoriamente 3 radículas de cada caixa com o auxílio de uma pinça e fixadas em solução Carnoy (álcool etílico/ácido acético 3:1 v/v) por 12h em temperatura ambiente. Na sequência, foi realizado a troca por um novo fixador, no qual as amostras permaneceram armazenadas a 4°C até o momento da confecção das lâminas.

Para o preparo das lâminas, as radículas foram retiradas do fixador e lavadas com água destilada. Posteriormente, a hidrólise foi realizada com HCL 1 N, previamente estabilizado em banho-maria a 60 °C, no intervalo de 8 a 11 minutos para não danificar as raízes, a qual foi imediatamente interrompida com banhos de água destilada. A coloração foi realizada com carmim acético 2% em duas etapas, sendo que na pré-coloração as radículas foram deixadas por 10 min em contato com o corante. Após remover o excesso de Carmim, separou-se a região meristemática de cada radícula, abrindo-a com um estilete. Por fim, realizou-se a coloração final

com o mesmo corante por mais 5 min e, posteriormente, uma lamínula foi adicionada.

A análise das lâminas foi realizada em microscopia de luz, com aumento de 40X, sendo analisadas 1000 células por lâmina. A avaliação foi realizada às cegas, por um único pesquisador, de modo a percorrer a lâmina sem repetir campos visuais.

Nas lâminas foi analisado o ciclo celular por meio da quantificação das células em cada fase do ciclo, sendo contabilizadas as células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. A partir disso foi determinado o índice mitótico (IM) por meio da equação 2 a seguir:

$$IM = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número de células avaliadas}} \times 100$$

(Equação 2)

Durante a quantificação das células em cada fase do ciclo celular foram identificadas a presença de danos aos cromossomos e, a partir disso, realizado o cálculo do índice de aberrações cromossômicas (IAC), o qual é apresentado a seguir na equação 3.

$$IAC = \frac{\text{Número de células com aberrações cromossômicas}}{\text{Número de células avaliadas}} \times 100$$

(Equação 3)

4.2.7 Bioacumulação

Transcorridas 240h de incubação foi realizada a coleta de um *pool* de amostras por tratamento, contendo 90 plântulas cada. As plântulas foram adicionadas em frascos de vidro tipo penicilina, previamente lavados com solução de ácido nítrico 5%. Os frascos com as amostras foram vedados com plástico filme e levados para o freezer -80 °C por 24h. Após esse período, as amostras foram liofilizadas, utilizando um liofilizador Liotop L108, por 24h, no qual ficaram encubadas. Ao término desse processo as amostras foram encaminhadas ao Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo para análise de absorção atômica, para a determinação da concentração de Cd.

O processo de digestão foi realizado utilizando 100 mg de amostra seca, ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio aquecido a 200 °C em forno assistido por micro-ondas, em frascos fechados. O experimento foi realizado em duplicata. As leituras foram realizadas em Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos, com limite de detecção (LD) de 0,01 mg L⁻¹ (10 µg L⁻¹).

4.2.8 Análises estatísticas

As variáveis dependentes foram submetidas à análise dos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente. A taxa de germinação foi analisada por meio de uma ANOVA de medidas repetidas, considerando o tempo de exposição e concentrações testadas, seguido do teste *post hoc* de Fisher. Para os dados de crescimento radicular, índice mitótico (IM) e o índice de aberrações cromossômicas (IAC) utilizou-se ANOVA unifatorial, seguido pelo teste a posteriori de Fisher. Todas as análises foram realizadas ao nível de significância de 5% e foram executadas por meio do programa Statistica (StatSoft versão 8.0).

Para a análise integrada das aberrações cromossômicas foi utilizado o índice integrado de biomarcadores (IBR) proposto por Sanchez, Burgeot e Porcher (2013). O IBR foi obtido por meio do programa Microsoft Excel 2016. Para os dados de bioacumulação apenas se extraiu a média e desvio padrão dos resultados por tratamento.

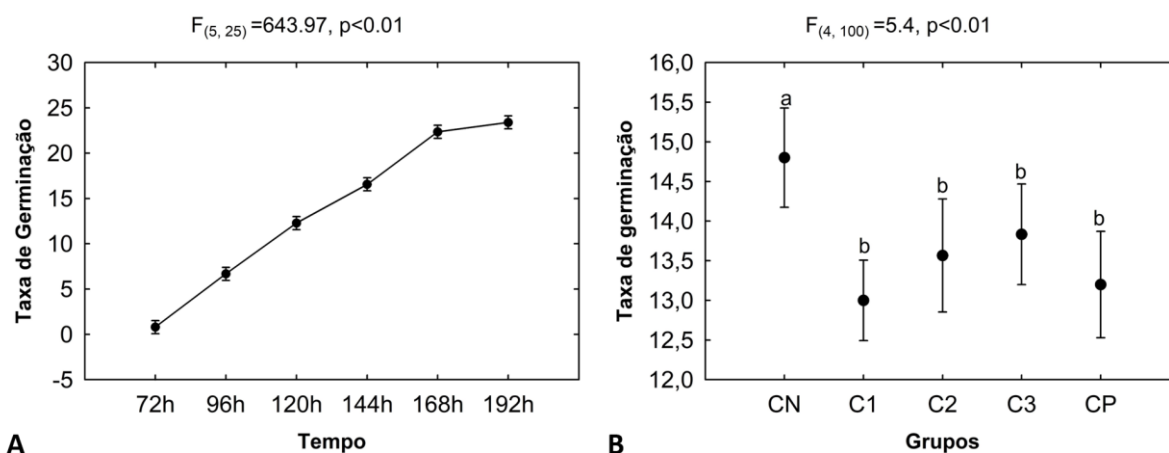
4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Fitotoxicidade

A germinação das sementes de *A. cepa* iniciou-se após 72h de incubação e apresentou um crescimento significativo no decorrer do tempo de exposição. Após 120h de exposição, em torno de metade das sementes haviam germinado independentemente do grupo testado e após 168h a taxa de germinação era de quase 100% (Gráfico 10A). Não foi observada interação entre os grupos avaliados e o tempo de exposição na resposta da taxa de germinação ($F_{20, 100} = 0.74$, $p > 0.05$).

Por outro lado, a taxa de germinação foi significativamente inferior em todas as concentrações de Cd testadas quando comparadas ao controle negativo, que apresentou uma taxa de germinação de 96%. As distintas concentrações de Cd (5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) e o controle positivo não diferiram estatisticamente entre si, sendo possível observar uma tendência de redução da germinação na concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd, mas de maneira não significativa (Gráfico 10B).

Gráfico 10 – Taxa de germinação das sementes de *Allium cepa* expostas a concentrações de Cd



A) Taxa de germinação em função do tempo de exposição. B) Taxa de germinação em função dos grupos experimentais. F= resultado da ANOVA; p= probabilidade de aceitar a hipótese nula. As letras sobre as barras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de post hoc de Fisher

Fonte: Autoria própria (2023)

Com base nos resultados, verificou-se que todas as concentrações de Cd provocaram redução significativa da germinação. A menor concentração testada (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentou uma tendência em intensificar os danos, pois foi observada uma leve redução da taxa de germinação nessa concentração em relação às demais. Embora inconclusivo nesta base de dados, a menor concentração pode indicar maior biodisponibilidade e capacidade de penetrar nas células da radícula. Outra hipótese é de que as concentrações mais elevadas apresentem maiores chances de complexar com o papel ou sedimentar.

Em um estudo desenvolvido por Anwar *et al.* (2021) verificou-se uma redução significativa no crescimento e germinação de sementes de feijão mungo expostas em todas as concentrações de Cd testadas (25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g L}^{-1}$), corroborando com os resultados da presente pesquisa. De acordo com o estudo, as concentrações de Cd reduziram de forma significativa a atividade α -amilase das

sementes durante a germinação, bem como diminuíram o processo de hidrólise de carboidratos e proteínas, inibindo a translocação de açúcares e consequentemente a germinação e crescimento inicial da planta.

Resultados semelhantes também foram obtidos com sementes de manjeriço, que sofreram uma redução e atraso na germinação (FATTAHI *et al.*, 2019), e da planta herbácea *Suaeda salsa* (LIU *et al.*, 2012). Em sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.), a toxicidade do Cd sobre a germinação e crescimento foi resultado de uma interrupção das vias metabólicas comprometendo a disponibilidade de nutrientes. O Cd inibiu a liberação e alocação de aminoácidos livres armazenados nos tecidos vegetais, o que resultou na carência de nitrogênio nas sementes, inibindo assim o crescimento do embrião (JAOUANI *et al.*, 2018). Desta forma, sugere-se que a germinação foi reduzida na presença das concentrações de Cd devido a imobilização de nutrientes pelo bloqueio de vias metabólicas importantes.

Por outro lado, não se observou no presente estudo diferenças significativas entre os grupos tratados com Cd e controles em relação ao comprimento das radículas ($F_{4,25} = 2.03$; $p > 0.05$). Essa questão pode ser explicada pelas concentrações muito baixas de Cd utilizadas no estudo, sendo de 10 a 100 vezes inferiores ao de outras pesquisas (Anwar *et al.* 2021; FATTAHI *et al.*, 2019; JAOUANI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2012).

Por fim, ressalta-se que esses parâmetros agronômicos representam a formação de plântulas normais e saudáveis, estando associados ao vigor que consiste na emergência rápida e elevada, resultando em um grande número de mudas, (CARVALHO *et al.*, 2023). Portanto, danos à germinação e crescimento podem resultar na redução da produtividade agrícola.

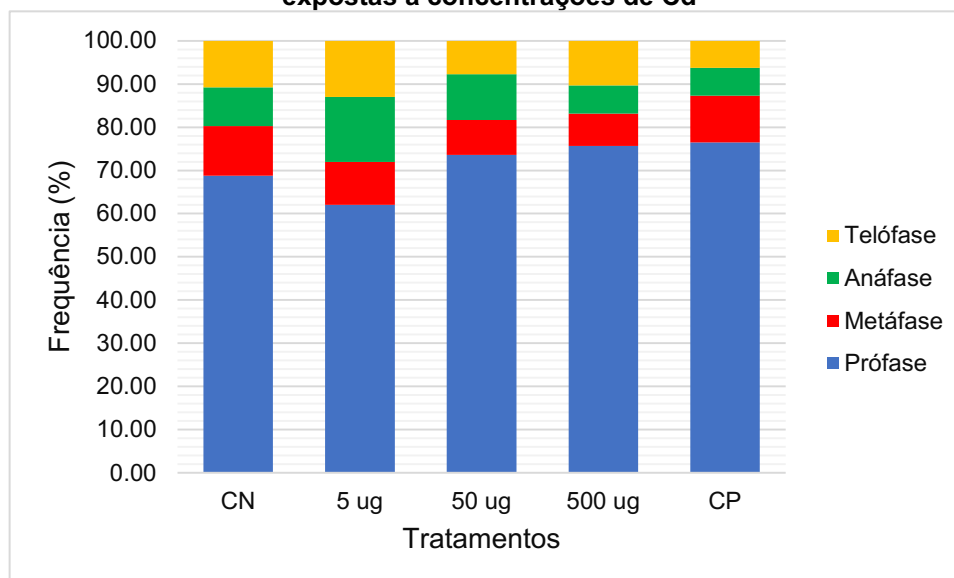
4.3.2 Citogenotoxicidade

Após os dados do índice mitótico (IM) serem submetidos à ANOVA, verificou-se que os grupos experimentais não apresentam diferenças significativas entre si (IM: $F_{(4, 20)} = 1.1149$, $p = 0.38$), ou seja, não houve efeito significativo na proporção de células nas diferentes fases da mitose entre os tratamentos.

A análise de frequência das fases do ciclo celular realizada no programa Microsoft Excel 2016 revelou poucas alterações do ciclo celular. Em todos os grupos experimentais as células em prófase e metáfase apresentaram frequência bastante

similares. Juntas, as células em prófase e metáfase representaram 80% ou mais das células em divisão, exceto na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, onde representaram pouco mais de 70%. Além disso, na menor concentração testada ($5 \mu\text{g L}^{-1}$), a anáfase e a telófase foram as fases que apresentaram maior frequência em relação aos demais tratamentos (Gráfico 11), o que pode indicar atraso na divisão celular.

Gráfico 11 - Frequência percentual das fases do ciclo celular das plântulas de *Allium cepa* expostas a concentrações de Cd

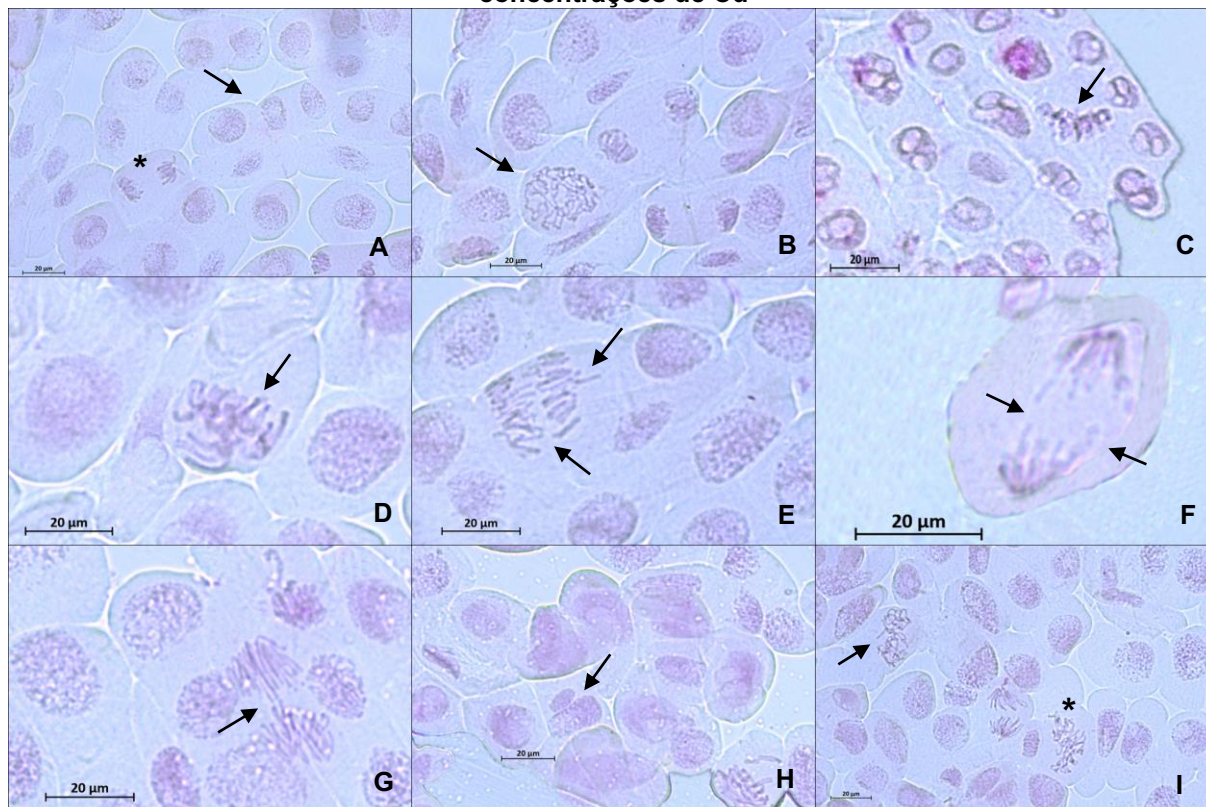


Fonte: Autoria própria (2023).

A tendência da menor concentração de Cd ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) provocar um estímulo à divisão celular pode estar relacionada à hormese química, um efeito dose-resposta provocado pela exposição à substâncias químicas, em que baixas concentrações causam um efeito estimulante e altas concentrações provocam inibição, ou seja, efeito contrário (CALABRESE; BLAIN, 2009; MUSHAK, 2016). O desencadeamento da hormese pelo Cd pode provocar danos ao DNA, mutações e aberrações cromossômicas, resultando em alterações do ciclo celular (CARVALHO; CASTRO; AZEVEDO, 2020). Esse efeito também prepara os organismos e plantas para o estresse, ativando respostas adaptativas universais a estressores de baixas concentrações (AGATHOKLEOUS; LIU; CALABRESE, 2023; EROFEEVA, 2022).

Embora as concentrações de Cd utilizadas neste estudo não tenham afetado significativamente o ciclo celular, promoveram aberrações cromossômicas importantes, tais como aderências, micronúcleos (MN), cromossomos atrasados, perda/quebras cromossômicas, C-metáfases e pontes anafásicas (Fotografia 3).

Fotografia 3 – Aberrações cromossômicas em células de *A. cepa* após a exposição a concentrações de Cd



A) Células normais intérfase (seta) e anáfase (*). B) Aderência cromossômica. C-D) C-metáfase. E) Perda/quebra cromossômica. F) Cromossomos atrasados. G) Ponte anafásica. H) Micronúcleo. I) Imagem panorâmica das células em divisão com aberrações cromossômicas: perdas/quebras (seta), C-metáfase (*)

Fonte: Autoria própria (2023)

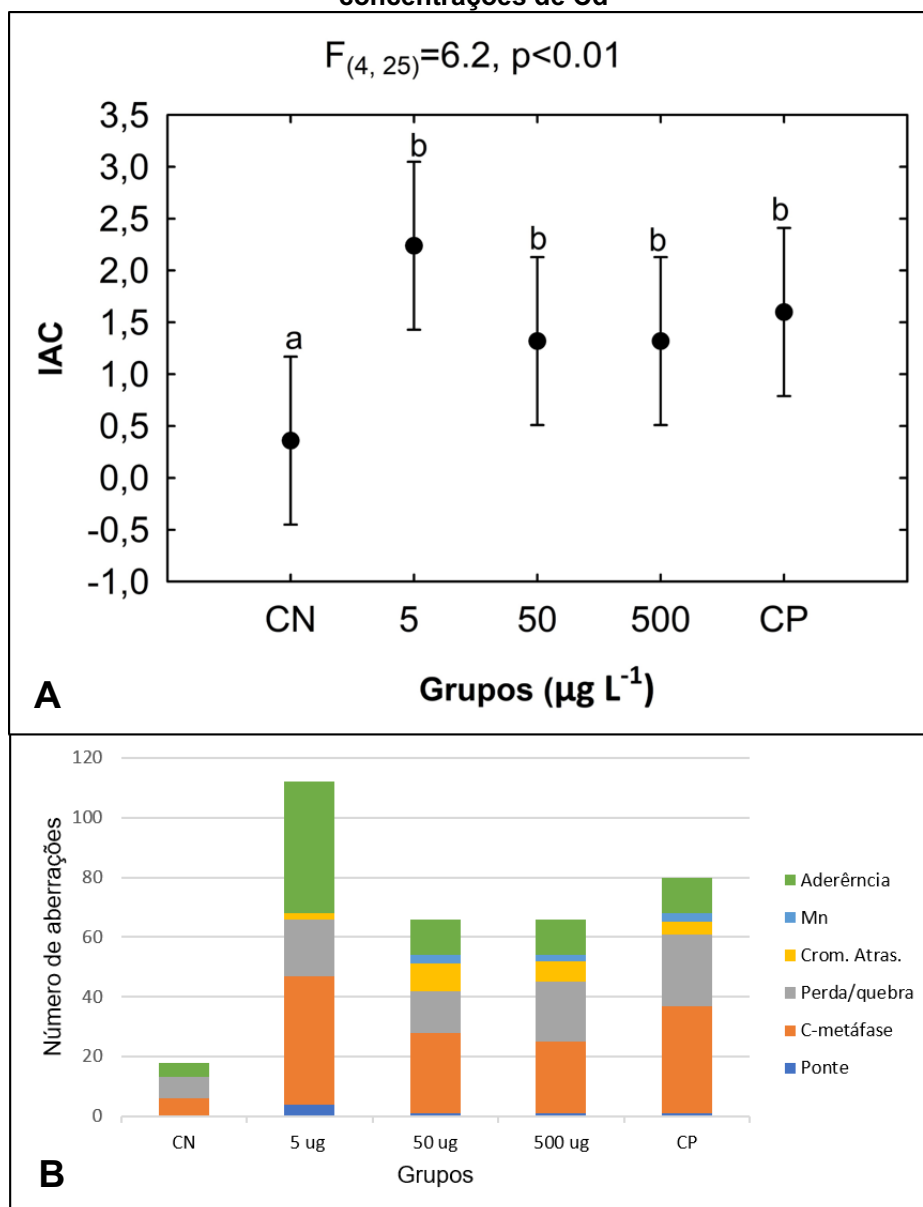
A partir do índice de aberrações cromossômicas (IAC) observou-se um aumento significativo de danos citogenotóxicos em todas as concentrações de Cd testadas (Gráfico 12A). Entretanto vale ressaltar que embora a concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ não diferiu estatisticamente das demais concentrações de Cd e do controle positivo é possível observar um efeito mais acentuado nessa concentração. As concentrações de Cd e o controle positivo apresentaram IAC semelhantes entre si, mas diferiram significativamente em relação ao controle negativo.

Observou-se que a concentração que apresentou a maior incidência de aberrações foi a de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gráfico 12B), constatando dessa forma a tendência do aumento de aberrações cromossômicas provocados pela exposição à menor concentração de Cd, o que já havia sido identificado por meio do IAC. Essa tendência reforça o possível efeito de hormese química, uma vez que diversos estudos apontam que o Cd tem efeito hormético em diversas espécies de plantas (CARVALHO; CASTRO; AZEVEDO, 2020). Vale destacar que a hormese não

depende apenas da concentração, mas também do tempo de exposição ao Cd e da sensibilidade dos biomarcadores para avaliar a questão, visto os moleculares são mais responsivos (ZHANG *et al.*, 2023).

No gráfico 12B, ainda é possível observar que a C-metáfase foi o dano que apresentou maior frequência em todas as concentrações testadas, seguido por quebra cromossômica. A menor concentração de Cd ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) foi a que provocou maior incidência de aderências, pontes anafásicas e de C-metáfases. Sugere-se que nessa concentração, o composto tenha sido absorvido com maior facilidade pelas células vegetais, tornando-se mais disponível e, dessa forma, induzindo maior ocorrência de anormalidades cromossômicas.

Gráfico 12 – Aberrações cromossômicas observadas em plântulas de *Allium cepa*, expostas a concentrações de Cd



A) Índice de aberrações cromossômicas (IAC). B) Número e variedades de aberrações cromossômicas identificadas em plântulas de *A. cepa*. F= resultado da ANOVA; p= probabilidade de aceitar a hipótese nula. As letras sobre as barras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de post hoc de Fisher
Fonte: Autoria própria (2023)

A C-metáfase foi o tipo de dano mais identificado em todas as concentrações de Cd testadas, indicando um estresse provocado por substâncias tóxicas. Na C-metáfase a organização nucleolar dos cromossomos é afetada (BONCIU, *et al.*, 2018; SABEEN *et al.*, 2020). Assim como o presente estudo, a elevada ocorrência de perda/quebra cromossômica, após exposição de *Allium cepa* ao Cd, também foi observada por Banerjee *et al.*, (2021). Em outras pesquisas também foram identificados efeitos citogenotóxicos como aberrações cromossômicas e presença

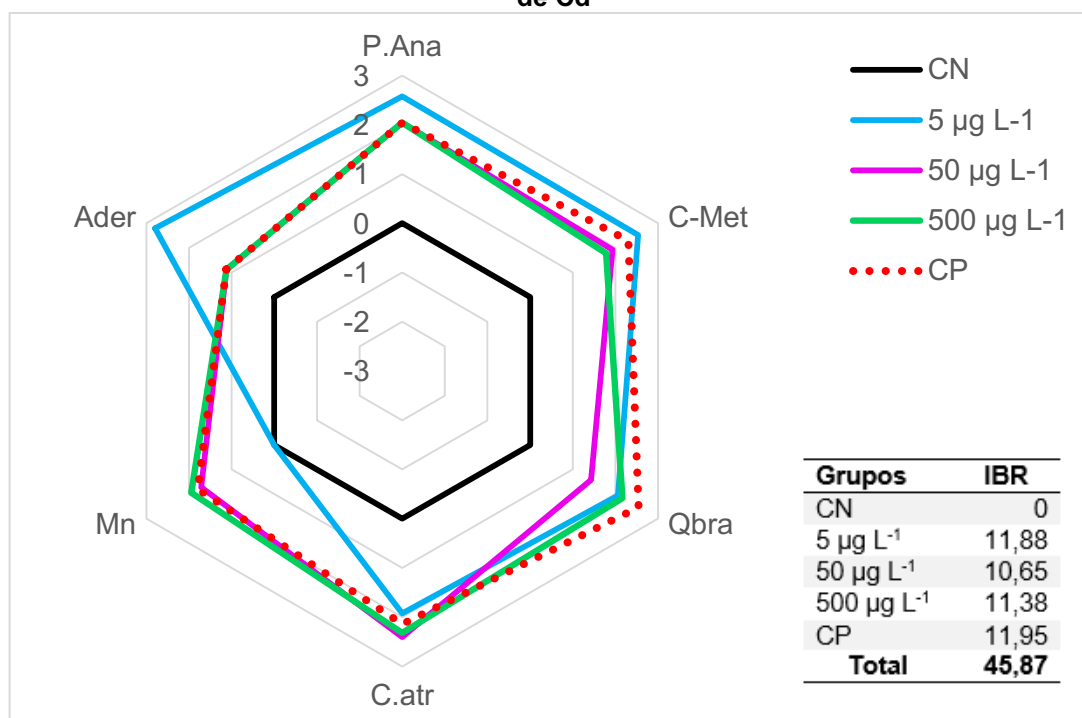
de micronúcleos em *A. cepa* exposto a concentrações de Cd ($3 \mu\text{g L}^{-1}$, 10, 20 e $40 \mu\text{M}$) (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; SETH *et al.*, 2008).

Frequência elevada de C-metáfases indicam a inativação completa do fuso mitótico das células, pois quando ocorre essa inativação, os cromossomos não são organizados corretamente no equador da célula, resultando assim na incorreta divisão dos centrômeros e a separação das cromátides irmãs para os lados opostos. Problemas no fuso mitótico podem ser atribuídos a alterações no funcionamento do citoesqueleto (principalmente alfa e beta tubulina) e erros nos pontos de checagem mitóticos (PIZZAIA, 2013). Sugere-se que essas alterações tenham contribuído para fixação da elevada frequência de quebras cromossômicas observadas.

A determinação do índice de resposta de biomarcadores (IBR) permitiu analisar de forma integrada os dados das aberrações cromossômicas, identificando pontualmente as respostas em comparação ao controle (BISSON, 2018). Observou-se uma maior incidência de aberrações em todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo. Também é possível constatar que as concentrações de 50 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram efeitos bastante similares ao controle positivo (MMS), sendo a aderência o dano menos observado. Já a concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ não provocou o surgimento de micronúcleos, mas ocasionou uma maior incidência de danos como aderência, principalmente, seguida de pontes anafásicas e C-metáfases.

Observando os dados numéricos é possível constatar que além do controle positivo que apresentou IBR de 11.95, a concentração de Cd que obteve o maior índice foi a de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (IBR= 11.88), seguida da concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (11.38), $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (10.65) e controle negativo (0). Embora a diferença entre os índices não seja expressiva, exceto em relação ao controle negativo, é possível estimar uma tendência aumentada da menor concentração de Cd provocar estímulos ao surgimento de aberrações cromossômicas. Esses dados corroboram com os resultados contemplados pelas demais análises, os quais foram anteriormente apresentadas.

Gráfico 13 – Índice integrado de biomarcadores (IBR) obtido a partir dos resultados de aberrações cromossômicas em plântulas de *Allium cepa* expostas a distintas concentrações de Cd



As linhas acima do controle negativo representado pelo número 0 (linha preta), indicam um aumento das aberrações cromossômicas

Fonte: Autoria própria (2023)

Vale ressaltar que embora a concentração de 5 µg L⁻¹ tenha apresentado uma tendência em intensificar os efeitos citogenotóxicos, ela enquadra-se dentro dos limites máximos admitidos pela resolução CONAMA 396 de 03 de abril de 2008 para ocorrência em águas subterrâneas para uso no abastecimento ou recreação e também pela USEPA para o consumo humano.

4.3.3 Bioacumulação

A detecção da presença de Cd nas plântulas de *A. cepa* indicou que houve bioacumulação na concentração de 500 µg L⁻¹ Cd, em média, 5,35 mg. kg⁻¹ de massa seca de amostra, sendo que nas demais concentrações, assim como no controle positivo e negativo, o Cd estava abaixo do limite de detecção do equipamento (Tabela 11), o que era previsível para os grupos controles. Portanto, *A. cepa* bioacumula Cd, porém, na massa utilizada para realizar as leituras, as menores concentrações de Cd (5 e 50 µg L⁻¹) estavam abaixo do limite de detecção

do equipamento, o que não significa que não houve bioacumulação das menores concentrações do respectivo metal.

Tabela 11 – Bioacumulação de Cd em plântulas de *A. cepa* expostas a distintas concentrações de Cd

Amostra	Bioacumulação (mg)	Desvio padrão
CN	< LD	-
CP	< LD	-
5 µg L ⁻¹	< LD	-
50 µg L ⁻¹	< LD	-
500 µg L ⁻¹	5,35	± 0,24

< LD: abaixo do limite de detecção

Fonte: Autoria própria (2023)

A bioacumulação consiste no aumento das concentrações de determinado elemento químico nos tecidos (WANG, 2016), excedendo o nível da dieta ou o nível do meio em que o organismo está inserido, como por exemplo, água ou ar (MONA *et al.*, 2023). Na agricultura, os metais pesados presentes nos fertilizantes acabam sendo depositados no solo e podem ser bioacumulados pelas plantas, pois o gradiente eletroquímico dos íons metálicos entre a membrana das células das radículas e o solo faz com que as plantas absorvam os metais pesados. Além do mais, as plantas e algas formam a base das cadeias alimentares (ZHANG *et al.*, 2021), promovendo dessa forma a transferência trófica de Cd e outros contaminantes à diferentes grupos de organismos (SOLIMAN *et al.*, 2022), incluindo os seres humanos.

A despeito da biodisponibilidade do Cd variar conforme as propriedades físico-químicas, geológicas e biológicas da água e do solo (ESCOBEDO MONDRAGÓN *et al.*, 2023), torna-se inegável a capacidade desse elemento tóxico de se incorporar e transitar nos compartimentos biológicos (ALONSO *et al.*, 2009; DUTTA *et al.*, 2019; LEWIS *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2023; MCDONALD; CRESSWELL; HASSELL, 2020; VALLADOLID-GARNICA *et al.*, 2023; WANG; LI, 2014). O Cd representa um risco crescente de impacto à biodiversidade e a saúde pública, uma vez que sua concentração tem aumentado consistentemente nos últimos 50 anos para manter uma crescente produtividade e industrialização. As doenças e danos já relatados, independente do grupo taxonômico, e os efeitos ecológicos em macroescala são problemas que deverão ser considerados no planejamento socioambiental.

4.4 Conclusão

Todas as concentrações de Cd apresentaram efeitos na taxa de germinação, no índice de aberrações cromossômicas e no IBR, indicando dessa forma que o Cd causa uma disfunção severa no desenvolvimento das plântulas *de A. cepa*.

De acordo com os resultados obtidos pode-se reafirmar a sensibilidade do teste *Allium cepa*, considerando que foram observados efeitos em todas as concentrações testadas, bem como o potencial fitotóxico e citogenotóxico do Cd, inclusive em baixas concentrações. A capacidade bioacumulativa verificada, corroborada pela literatura, representa um risco à outras espécies, considerando a transferência trófica.

Vale ressaltar que embora a menor concentração testada ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) não tenha diferido estatisticamente das demais concentrações, esta concentração apresentou uma tendência em intensificar tanto os danos fitotóxicos quanto os genotóxicos, levantando uma dúvida quanto à segurança dessa concentração, a qual atualmente é permitida pela legislação ambiental. Com base nos efeitos citogenotóxicos observados reforça-se a hipótese de que concentrações de Cd testadas no presente estudo possam exercer efeitos nocivos à biota aquática.

5 SOBREVIVÊNCIA E DANOS MORFOLÓGICOS NA FASE EMBRIO-LARVAL DE *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES) EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES REALÍSTICAS DE CÁDMIO

5.1 Introdução

O Cádmio é um metal pesado extremamente tóxico e bioacumulativo descoberto inicialmente como uma impureza do carbonato de zinco (ZHANG; REYNOLDS, 2019). Também possui amplo uso industrial, sendo empregado na fabricação de pilhas e baterias, pigmentos, na estabilização de plásticos, entre outros (WANG *et al.*, 2023). Entretanto, as indústrias não são as únicas fontes de poluição de Cd, sendo que as atividades agrícolas contribuem de maneira bastante expressiva para o problema, principalmente pelo uso de fertilizantes químicos (KHATUN; INTEKHAB; DHAK, 2022).

Por mais que os fertilizantes propiciem a reposição de nutrientes essenciais às plantas, o uso excessivo a longo prazo prejudica a qualidade do solo, resulta na diminuição do pH e deposição de metais pesados, o que consequentemente dificulta o desenvolvimento das plantas (KHATUN; INTEKHAB; DHAK, 2022). Essa contaminação ocorre principalmente pelo uso de fertilizantes químicos fosfatados (KUBIER; WILKIN; PICHLER, 2019), pois apresentam Cd em sua composição provenientes das rochas fosfáticas. Além dos fertilizantes químicos, o esterco bovino também é uma das portas de entrada desse oligoelemento, embora em menor proporção, uma vez que é aplicado nas lavouras como fertilizante orgânico e também possui metais pesados em sua constituição devido ao emprego desses como aditivos em rações e pela ingestão de plantas com bioacumulação de metais (GAO *et al.*, 2021).

Uma vez presente no solo, o Cd que não é absorvido pela vegetação é lixiviado e transportado aos ambientes aquáticos (KHATUN; INTEKHAB; DHAK, 2022). Por ser bioacumulativo e ter capacidade de magnificação trófica tem um grande potencial de provocar inúmeros danos à biota, atingindo distintos níveis tróficos, contaminando e acumulando-se em plantas, algas, peixes, crustáceos, moluscos, perpetuando-se nos níveis subsequentes podendo chegar ao homem (JÄRUP; ÅKESSON, 2009).

A fim de avaliar a toxicidade do Cd e/ou de outras substâncias xenobióticas presentes na água, bem como identificar e relacionar suas respostas, comumente são utilizados modelos biológicos em testes de toxicidade. Esses testes são extremamente importantes para identificar a periculosidade de compostos químicos. Neste sentido, os peixes são os vertebrados mais utilizados em bioensaios ecotoxicológicos sendo empregados na avaliação de grande parte das substâncias químicas (XIONG *et al.*, 2022).

A fase de desenvolvimento embrio-larval apresenta elevada sensibilidade e suscetibilidade à presença de poluentes, pois é uma fase metabolicamente acelerada e qualquer efeito pode resultar em malformações e comprometer a sobrevivência da espécie (KUROBE *et al.*, 2018; XIONG *et al.*, 2022). Além disso, os embriões apresentam rápido desenvolvimento, são de fácil aquisição, substituem a utilização de fases de desenvolvimento mais avançadas, trazendo benefícios no quesito ético, não demandando de grandes espaços, pois o bioensaio pode ser desenvolvido em microplacas ou placas de Petri; diminuindo assim resíduos de soluções (KUROBE *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2021; XIONG *et al.*, 2022). As respostas provenientes da exposição ainda podem ser estimadas para vertebrados superiores, prevendo assim possíveis efeitos à saúde humana (SU *et al.*, 2021).

Considerando que frequentemente é realizada aplicação de defensivos e fertilizantes nas lavouras e que os ambientes aquáticos em áreas sob influência agrícola recebem cargas elevadas de Cd e outros metais pesados (ZHOU *et al.*, 2020), o presente estudo buscou investigar se a exposição aguda às concentrações realísticas de Cd na fase embrio-larval do peixe nativo *Rhamdia quelen* (Quoy; Gaimard, 1824) promove efeitos tóxicos na sobrevivência e morfologia da espécie.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Produto e concentrações

O produto testado foi o cloreto de cádmio monohidratado ($\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$) grau P.A, de peso molecular de $201.33 \text{ g mol}^{-1}$ diluído em água ultrapura. As concentrações avaliadas foram 5, 50 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd. Um controle negativo foi estipulado e preparado apenas com água reconstituída ($0,0065 \text{ g.L}^{-1} \text{ CaCl}_2$; $0,1335 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4$; $0,0004 \text{ g.L}^{-1} \text{ KCl}$; $0,0105 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$). A determinação das

concentrações foi estipulada de acordo com os mesmos critérios apresentados anteriormente no capítulo 2, os quais podem ser verificados no subitem 4.2.1.

5.2.2 Preparo da solução de Cádmio

As soluções teste foram preparadas de acordo com a metodologia utilizada no bioensaio com a espécie *Allium cepa* e diluídas em água reconstituída. A metodologia empregada foi apresentada no subitem 4.2.2 do capítulo 2.

5.2.3 Espécie modelo

Foi definido como modelo biológico a espécie nativa *Rhamdia quelen* (jundiá), um peixe neotropical com ampla distribuição geográfica na América do Sul e Central, o qual é considerado como um bom modelo para avaliação da toxicidade dos ambientes aquáticos, pois apresenta elevada sensibilidade à presença de contaminantes (KITAMURA *et al.*, 2022). Além disso, essa espécie é de fácil aquisição, pois é amplamente cultivada em pisciculturas e se adapta bem a condições de laboratório (GOLIN *et al.*, 2022). É considerada uma espécie que apresenta rápido crescimento e fácil reprodução (PERUSSOLO *et al.*, 2019).

Além do mais, a espécie apresenta boa aceitação comercial, seu consumo é bastante apreciado, como também seu cultivo destinado à pesca recreativa (PERSCH *et al.*, 2017). É considerada uma espécie omnívora generalista, apresentando preferências por peixes, insetos, restos vegetais, crustáceos e detritos orgânicos, ou seja, sua alimentação não se restringe ao ambiente bentônico (GOMES *et al.*, 2000).

A espécie foi escolhida devido suas características biológicas e adaptativas, por ser uma espécie comercial nativa do Brasil, com ampla distribuição geográfica. Esses fatos justificam a determinação desta como espécie modelo.

5.2.4 Bioensaio

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *campus* Dois Vizinhos (UTFPR-DV), sob parecer de nº 23064.036441/2021-33.

Ovos fertilizados de *R. quelen* foram adquiridos em uma piscicultura comercial localizada no município de União da Vitória, região sul do Paraná, a qual realizou a indução reprodutiva de matrizes parentais a partir da aplicação de injeções intravenosas de extrato de hipófise de carpa. Nas fêmeas foram administradas duas injeções intramusculares de extrato de hipófise de carpa nas doses de 0,5 e 5 mg/kg, respectivamente, com intervalo de 6h entre as aplicações. Os machos receberam apenas uma injeção de 0,5 mg/kg de hipófise de carpa, ao mesmo tempo da segunda aplicação das fêmeas (BOMBARDELLI *et al.*, 2006). Transcorridas aproximadamente dez horas da última injeção, as matrizes parentais foram extrusadas manualmente e os gametas misturados cuidadosamente.

Posteriormente, os ovos fertilizados foram dispostos em sacos com água do próprio local, pH de neutro a levemente básico, mantidos à uma temperatura em torno de 25 °C, aerados, lacrados e transportados até o Laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Transcorridas oito horas após a fertilização (hpf), os ovos foram analisados em estereomicroscópio (lupa) com a finalidade de avaliar a sua viabilidade, constatando a fecundação e início da embriogênese. Foram considerados viáveis os ovos translúcidos, estando esses em divisão (BRITO *et al.* 2018), enquanto os demais com características opacas (Fotografia 4) foram considerados não fecundados e descartados.

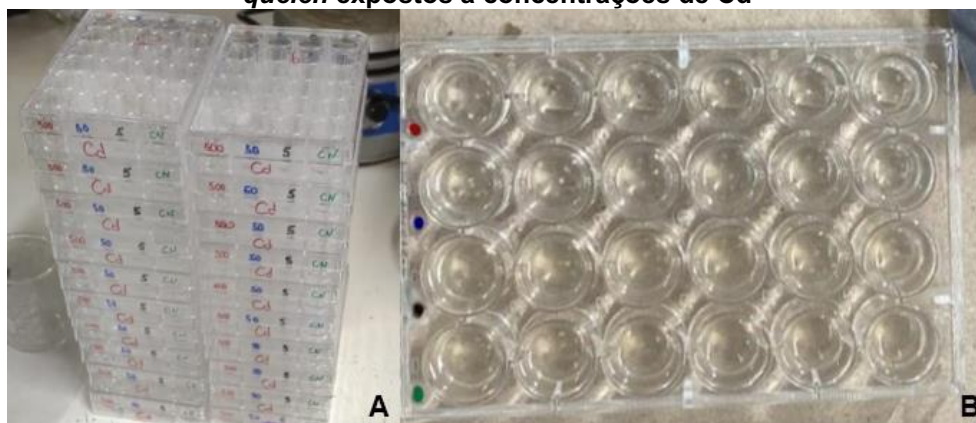
Fotografia 4 – Seleção dos ovos viáveis de *Rhamdia quelen* para o bioensaio



Ovos viáveis (translúcidos: círculo) e não viáveis (opacos: seta) sob uma placa de Petri
Fonte: Autoria própria (2023)

As soluções previamente preparadas foram pipetadas em microplacas de 24 poços, conforme o tratamento (Fotografia 5A). Em cada placa foram dispostos os quatro tratamentos aleatoriamente, sendo que cada concentração de Cd (5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) e o controle negativo ocuparam uma linha de seis poços em cada placa, sendo cada microplaca considerada uma réplica do experimento (Fotografia 5B).

Fotografia 5 – Microplacas de 24 poços utilizadas no ensaio de embriotoxidade de *Rhamdia quelen* expostos a concentrações de Cd



A) Microplacas utilizadas e identificadas de acordo com os tratamentos e repetições. B) Distribuição dos tratamentos na microplaca (vermelho: 500 $\mu\text{g/L}^{-1}$, azul: 50 $\mu\text{g/L}^{-1}$, preto: 5 $\mu\text{g/L}^{-1}$ e verde: controle negativo – água reconstituída)
Fonte: Autoria própria (2023)

Posteriormente, cinco ovos viáveis foram alocados de forma aleatória em cada poço com auxílio de pipetas Pasteur, em todas as microplacas, indistintamente. As microplacas foram mantidas em incubadora BOD com temperatura controlada em 25 °C e fotoperíodo desligado (escuro). Os ensaios foram realizados em microplacas para facilitar o manuseio e diminuir o volume de insumos e os rejeitos, sendo que cada poço teve um volume de 2,5 mL de solução.

O ensaio foi conduzido por 96hpf e composto por dois fatores-resposta: I) as concentrações de Cd testadas: 0, 5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; II) tempo de exposição: amostragens em 48 e 96hpf. Foram utilizadas um total de 20 réplicas, sendo 7 placas destinadas à avaliação da sobrevivência e o restante destinadas à análise de deformidades morfológicas em 48 e 96hpf. Ao todo, foram utilizados 2.400 ovos viáveis.

Durante o experimento foram realizadas trocas de 1 ml do volume da solução-teste de todos os poços a cada 24h (ensaio do tipo semiestático), com o objetivo de realizar a limpeza do local e dessa forma evitar alterações nos parâmetros da água. Como as larvas de *R. quelen* possuem reserva de nutrientes do saco vitelino até 4 dias pós fertilização (dpf) (BRITO *et al.*, 2018), não foi necessário oferecer alimentação externa, considerando que o ensaio foi encerrado logo após completar 96h de exposição.

5.2.5 Taxa de sobrevivência

Transcorridas 28 horas pós fertilização (hpf) deu-se início à avaliação da sobrevivência, a qual foi contabilizada diariamente em 7 microplacas até 96hpf. Foram consideradas vivas àquelas larvas que apresentavam batimentos cardíacos. O tempo inicial para avaliação da sobrevivência foi definido de acordo com o tempo descrito na literatura para início da eclosão da espécie, o qual ocorre a partir de 26hpf em temperatura próxima à empregada no presente trabalho (PEREIRA *et al.*, 2006; VIDAL; 2012).

5.2.6 Deformidades morfológicas e área corporal

O efeito sobre o desenvolvimento embrio-larval foi avaliado pelo conjunto das deformidades morfológicas e pela área corporal (mm^2). Cerca de 30 indivíduos por

tratamento foram coletados em quintuplicata com o auxílio de uma pipeta Pasteur, acondicionados em 6 tubos de 1,5 mL (5 indivíduos por tubo), anestesiados e fixados em formol a 5% nos tempos de 48 e 96hpf. As amostras foram mantidas em geladeira a 4 °C até o momento das análises.

A morfometria e as deformidades morfológicas foram avaliadas em estereomicroscópio com câmera acoplada, seguindo o procedimento proposto por Powers *et al.* (2011), sendo classificadas de acordo com as categorias de danos (axial, nadadeiras, craniofacial e torácico-abdominal). Dentro de cada categoria, as diferentes deformidades receberam uma pontuação conforme o seu grau de severidade (Tabela 12). Então, um índice de severidade por indivíduo foi calculado pela soma da pontuação de cada categoria e, posteriormente, foi obtido o índice das réplicas por meio da média dos índices individuais.

Tabela 12 - Grau de severidade das deformidades por categoria de danos

Categorias	Anormalidade	Grau de severidade
Axial	Atrofia corporal	4
	Enrolamento caudal	4
	Cifose/lordose/escoliose	4
Nadadeira	Danos	4
	Lesões	1
Crânio-facial	Deformidades faciais	3
	Olhos ausentes/reduzidos	4
	Edema ocular	4
	Deformidade bucal	4
	Barbilhão ausente/reduzido/retorcido	4
Torácico-abdominal	Distensão corporal (desnutrido)	2
	Edema cardíaco	4
	Edema do saco vitelino	4

Fonte: Autoria própria (2023)

Para a análise morfométrica foi mensurada a área corporal (mm²) de cada indivíduo amostrado. As medições foram realizadas por meio da captura de imagens da câmera acoplada ao estereomicroscópio Zeiss e das ferramentas do programa Zen 2.3 lite.

5.2.7 Análise estatística

As variáveis dependentes foram previamente submetidas à análise dos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente. A sobrevivência foi analisada por meio da ANOVA de medidas repetidas, considerando o tempo de

exposição e concentrações testadas, seguido do teste *post hoc* de Fisher. As deformidades e a área corporal foram analisadas de forma independente nos períodos de 48 e 96hpf devido à alta mortalidade observada no último tempo, nas maiores concentrações de Cd. Assim, aplicou-se uma ANOVA unifatorial, seguida do teste *post hoc* de Fisher.

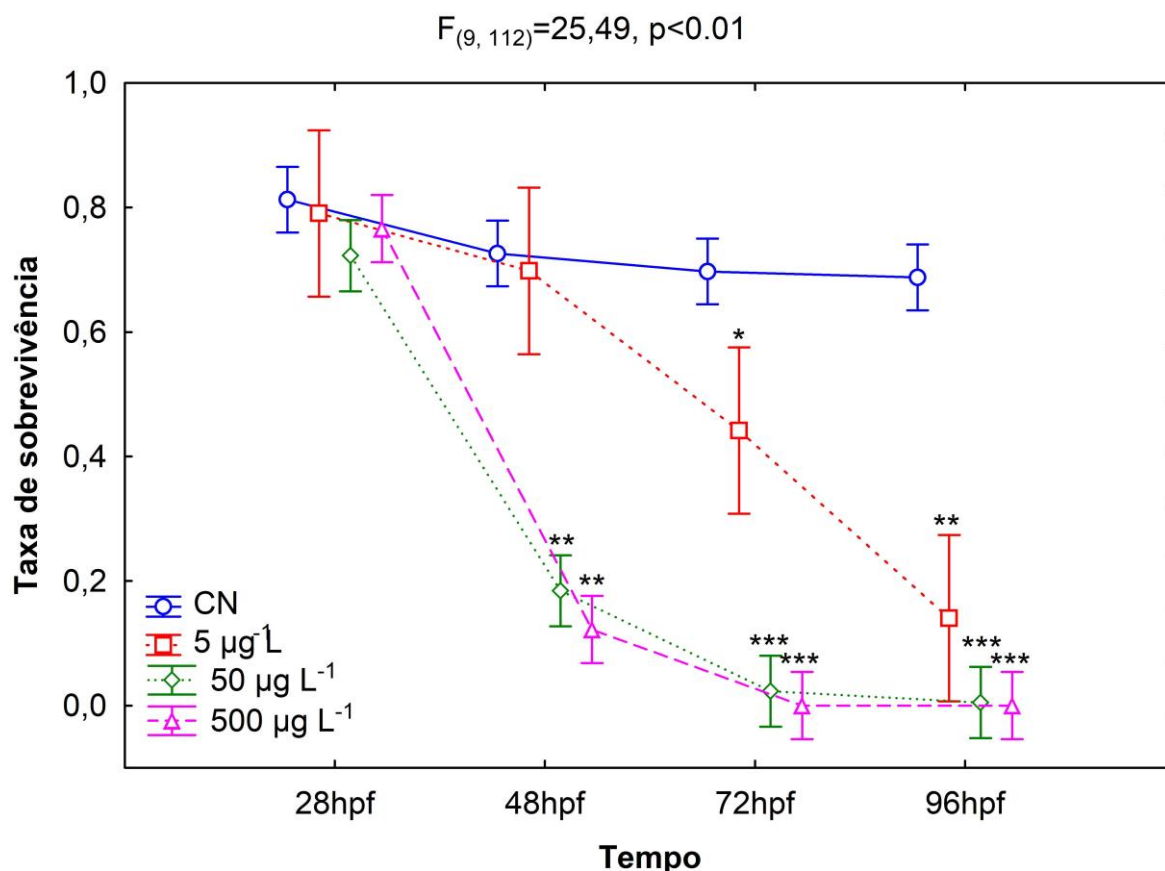
Os dados do índice de severidade de deformidades e da área corporal dos animais submetidos apenas na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e do controle negativo, em 96hpf, foram submetidos à ANOVA bifatorial (concentração x tempo), seguida do teste de Fisher, devido à maior sobrevivência das larvas desses grupos. Todas as análises foram realizadas ao nível de significância de 5% e foram executadas por meio do programa Statistica (StatSoft versão 8.0).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Taxa de sobrevivência

Ambos os fatores analisados, tempo de exposição e concentração, interferiram na sobrevivência das larvas (Gráfico 14). A eclosão das larvas em 28hpf foi similar em todos os grupos experimentais, porém a partir de 48hpf, a sobrevivência foi reduzida significativamente nas concentrações de 50 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle e a menor concentração de Cd, as quais apresentaram resultados semelhantes entre si no respectivo período.

Após 72hpf, também se observou uma redução significativa da sobrevivência na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd em relação ao controle. Em 96hpf, a taxa de sobrevivência foi extremamente reduzida em todas as concentrações de Cd testadas, onde as concentrações de 50 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd não apresentaram diferenças significativas entre si, mas diferiram significativamente em relação a menor concentração de Cd. Em 96hpf a sobrevivência foi quase nula nas concentrações de 50 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, muito baixa em $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd (em torno de 14%) e normal no controle (72%).

Gráfico 14 – Sobrevivência das larvas de *R. quelen* expostas a concentrações de Cd

(*) Diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Fisher para os fatores concentração de Cd e tempo de exposição
 Fonte: Autoria própria (2023)

A avaliação da sobrevivência é extremamente importante para verificar a toxicidade de produtos químicos e mensurar os riscos da exposição à manutenção das espécies nos habitats naturais (AZEVEDO-LINHARES *et al.*, 2018). Peixes são organismos muito utilizados para definir a sensibilidade e os efeitos tóxicos de metais, sendo a letalidade um ponto final frequentemente avaliado e exigida por regulamentações ambientais e por diretrizes de remediação de impactos ambientais (FERRO; FERRARI; EISSA, 2021).

Entretanto, na literatura em grande parte dos estudos que avaliam os efeitos da exposição ao Cd são utilizadas altas concentrações do metal, deixando lacunas a respeito dos efeitos provocadas por baixas doses desse contaminante (PAUL; SMALL, 2021), principalmente em fases iniciais de desenvolvimento.

Os peixes são extremamente vulneráveis à presença de Cd, pois possuem diversas vias de exposição. Em um estudo desenvolvido por Paul e Small (2021), juvenis de *Ictalurus punctatus* expostos ao Cd apresentaram redução significativa da

taxa de sobrevivência. Considerando que as fases iniciais de desenvolvimento apresentam maior sensibilidade, esses efeitos são potencializados, dificultando a viabilidade populacional em ambientes naturais contaminados.

Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, concentrações ambientalmente relevantes de Cd (2,5, 25, 250, 2.500 e 25.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), também exerceram efeitos agudos significativos na eclosão e na sobrevivência larval da espécie de peixe *Prochilodus magdalenae*, após exposição de apenas 1, 2 e 3 horas (SIERRA-MARQUEZ *et al.*, 2019). No estudo de Benaduce *et al.* (2008), larvas de *R. quelen* foram expostas à 0,5, 4,5, 8 e 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd, em dois níveis de alcalinidade (63 e 92 mg/L CaCO_3), avaliando os tempos de 3 e 21 dias, sendo observado efeitos bastante expressivos na sobrevivência das larvas, principalmente na água de menor alcalinidade. Assim como o presente estudo, as maiores concentrações apresentaram efeitos mais severos, não sendo observado sobreviventes na concentração de 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ após 21 dias.

Em outro estudo, Guo *et al.*, (2017), ao analisarem o desenvolvimento de larvas de *Danio rerio* expostas a 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd, verificaram um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), com um desbalanço pró-oxidativo. Em animais juvenis e adultos é relatado na literatura que o Cd induz a apoptose, um mecanismo desenvolvido para eliminar células indesejadas ou defeituosas e, geralmente é intensificado pelo estresse oxidativo. Ele age inibindo a caspase-3, uma enzima que regula a apoptose, levando ao desenvolvimento de patologias graves, como o acúmulo e imobilização de substâncias importantes, necroses e neoplasias em órgãos importantes, como por exemplo o fígado (TEMPLETON; LIU, 2010). No bioensaio desenvolvido por Vicentini *et al.*, (2022), fêmeas de *R. quelen* expostas a concentrações realísticas de Cd apresentaram estresse oxidativo relacionado à danos histopatológicos e disfunções reprodutivas.

Esse conjunto de evidências, associados aos resultados de deformidades morfológicas que serão apresentados a seguir, fornecem pistas sobre os possíveis mecanismos que levaram a elevada e acelerada letalidade observada no presente estudo, principalmente nas maiores concentrações (50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd). Considerando que na fase embrio-larval a organogênese está em pleno curso e a formação, desenvolvimento e funcionamento dos órgãos estão incompletos, a exposição ao Cd pode ter gerado um desbalanço oxidativo conforme verificado por

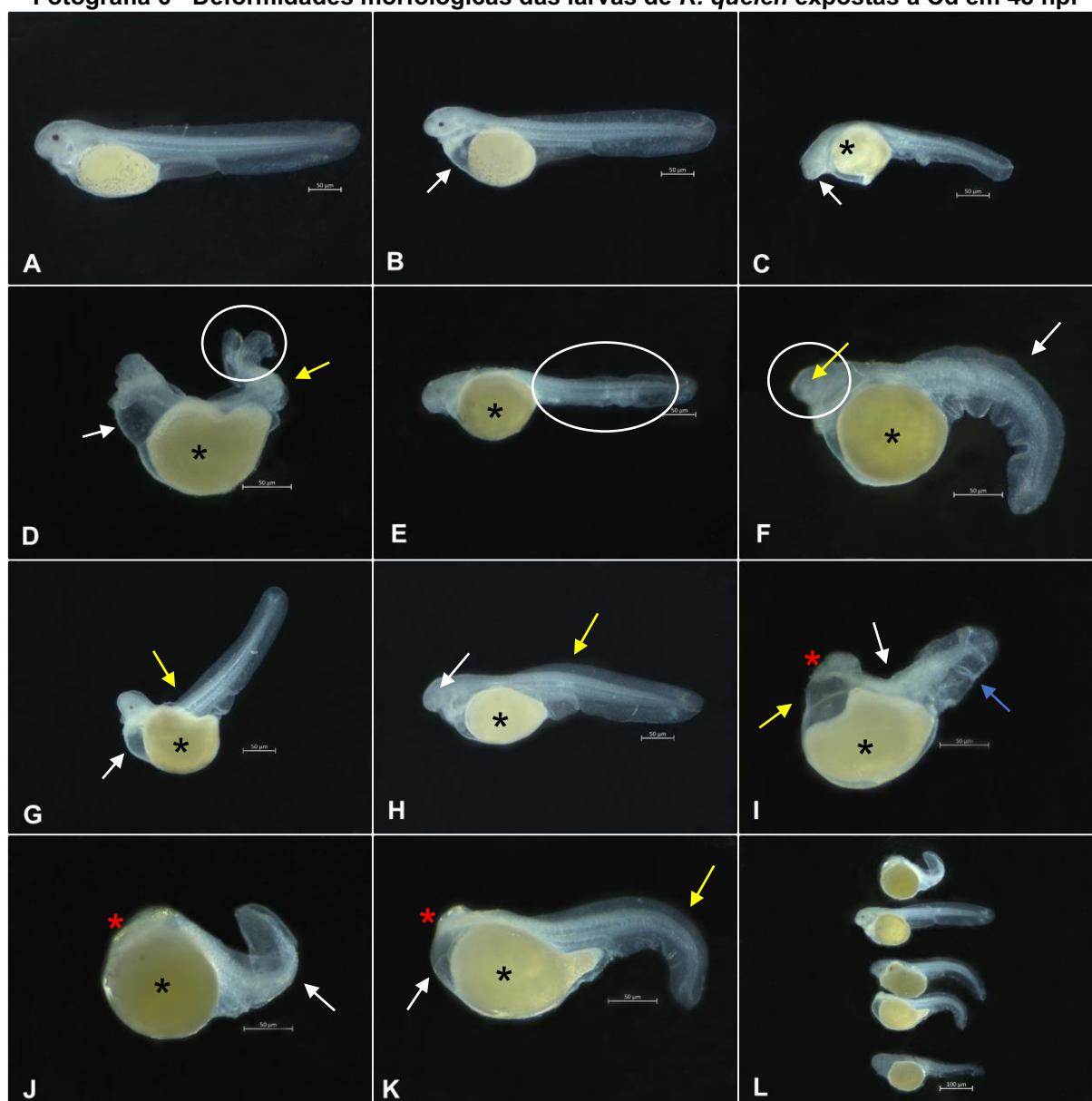
Wagh, Osborne e Sivarajan (2023), comprometendo e inviabilizando a sobrevivência.

5.3.2 Deformidades morfológicas e área corporal

Analisando as deformidades em 48hpf foram identificados diversos danos morfológicos como edema cardíaco e do saco vitelino, atrofia corporal, desnutrição, ausência de olhos, escoliose, lordose, cifose, bifurcação de cauda, deformidades faciais e bucais, danos nas nadadeiras e ausência de cabeça (Fotografia 6).

Em função da elevada mortalidade provocada pelas concentrações de 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd, no período de 96hpf não foi possível realizar a coleta e análise de deformidades das respectivas concentrações, somente da concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e do controle negativo. No maior tempo de exposição, as deformidades observadas na menor concentração testada (5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd) foram: edema do saco vitelino, atrofia corporal, escoliose, lordose, cifose, desnutrição, edema cardíaco, deformidades faciais e bucais, danos nas nadadeiras e ausência de olhos (Fotografia 7).

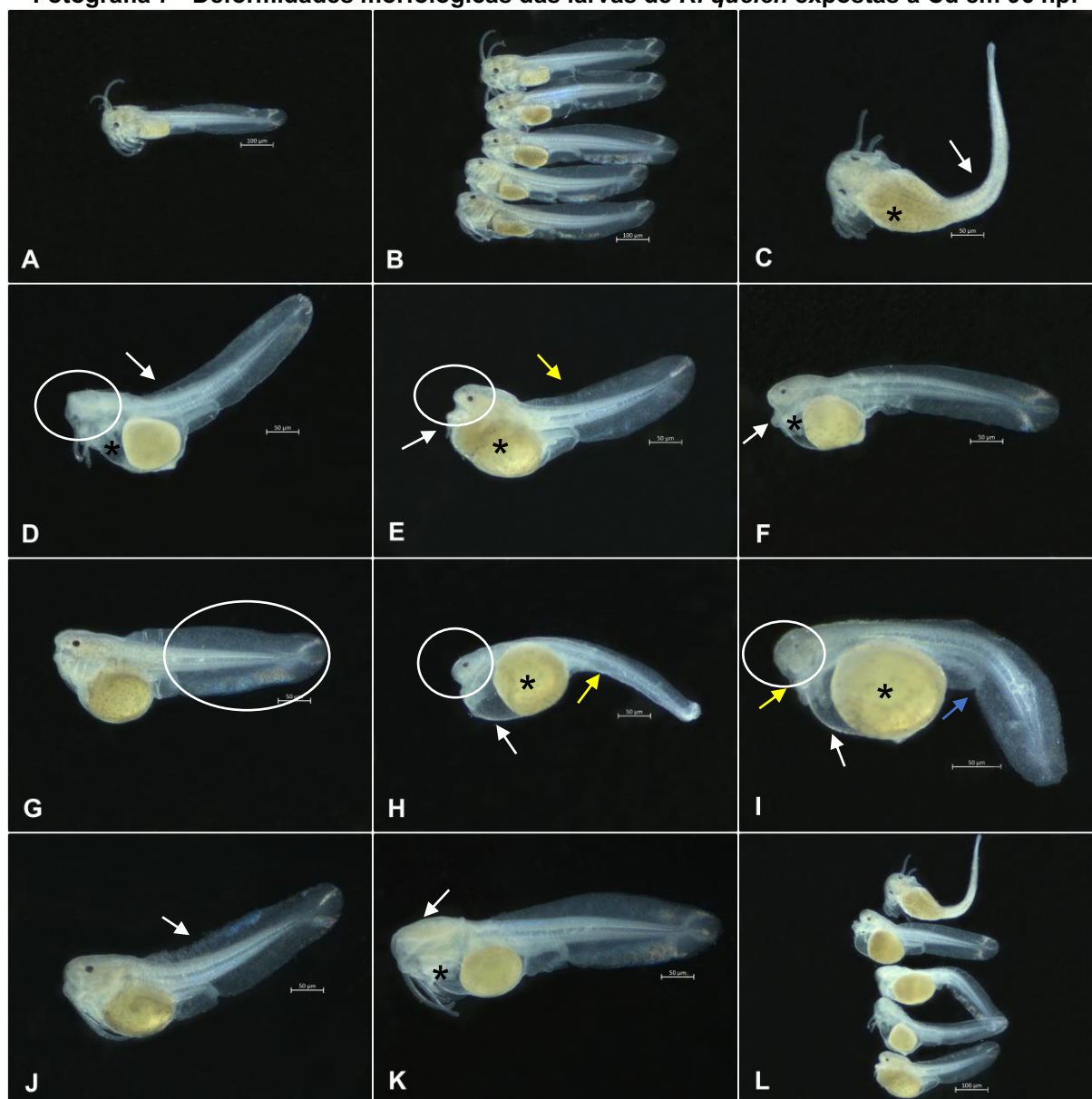
Fotografia 6 - Deformidades morfológicas das larvas de *R. quelen* expostas a Cd em 48 hpf



A) Larva normal em 48 hpf. B) Larva com edema cardíaco (seta). C) Larva com desnutrição, atrofia, edema do saco vitelino (*) e ausência de olhos (seta). D) Larva com edema cardíaco (seta branca), edema do saco vitelino (*), escoliose (seta amarela) e bifurcação de cauda (círculo). E) Larva com edema do saco vitelino (*) e com danos nas nadadeiras (círculo). F) Larva com ausência de olhos (seta amarela), deformidades faciais e bucais (círculo), edema do saco vitelino (*) e cifose (seta). G) Larva com edema cardíaco (seta), edema do saco vitelino (*) e lordose (seta amarela). H) Larva com ausência de olhos (seta), edema do saco vitelino (*) e escoliose (seta amarela). I). Larva com atrofia, lordose (seta), danos nas nadadeiras (seta azul), edema do saco vitelino (*), edema cardíaco (seta amarela) e ausência de cabeça (*). J) Larva com atrofia, edema do saco vitelino (*), ausência de cabeça (*) e escoliose (seta). K) Larva com atrofia, edema cardíaco (seta), edema do saco vitelino (*), ausência de cabeça (*) e cifose (seta amarela). L) Fotografia panorâmica das larvas com deformidades.

Fonte: Autoria própria (2023)

Fotografia 7 - Deformidades morfológicas das larvas de *R. quelen* expostas a Cd em 96 hpf



A) Larva normal em 96 hpf. B) Fotografia panorâmica das larvas normais em 96 hpf. C) Larva com atrofia, edema do saco vitelino (*) e escoliose (seta). D) Larva com ausência de olhos (círculo), edema cardíaco (*) e lordose (seta). E) Larva com deformidades faciais (círculo), barbilhões reduzidos (seta), lordose (seta amarela) e edema do saco vitelino (*). F) Larva com edema cardíaco (*) e ausência de barbilhões (seta). G) Larva com atrofia (círculo). H) Larva com desnutrição, deformidades faciais e ausência de barbilhão (círculo), edema cardíaco (seta), edema do saco vitelino (*) e cifose (seta amarela). I) Larva com deformidades faciais e bucais (círculo), ausência de barbilhão (seta amarela), cifose (seta azul) e edema cardíaco (seta). J) Larva com atrofia e lordose (seta). K) Larva com ausência de olhos (seta) e edema cardíaco (*). L) Fotografia panorâmica das larvas com deformidades.

Fonte: Autoria própria (2023)

A partir da ANOVA, observou-se que em 48hpf todas as concentrações testadas induziram efeitos negativos no desenvolvimento larval, com um aumento gradativo no índice de deformidades conforme o aumento da concentração de Cd (Gráfico 15 A), apresentando dessa forma maior severidade na concentração de 500

$\mu\text{g L}^{-1}$. A área corporal também foi afetada no período em questão, tendo uma redução bastante expressiva nas concentrações de 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já a concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ não diferiu estatisticamente do controle negativo (Gráfico 15 B).

Para o tempo de 96hpf apenas as larvas do controle e de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd foram analisadas, em função da letalidade das concentrações superiores. O índice de deformidades e o tamanho das larvas foram drasticamente afetados pela exposição à menor concentração de Cd. As larvas expostas à concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd apresentaram um índice de deformidades bastante superior em relação ao controle no período de 96hpf (Gráfico 15 C). A área corporal das larvas expostas à menor concentração Cd apresentou significativa redução em 96hpf (Gráfico 15 D), diferentemente do que aconteceu para essa mesma concentração no período de 48hpf.

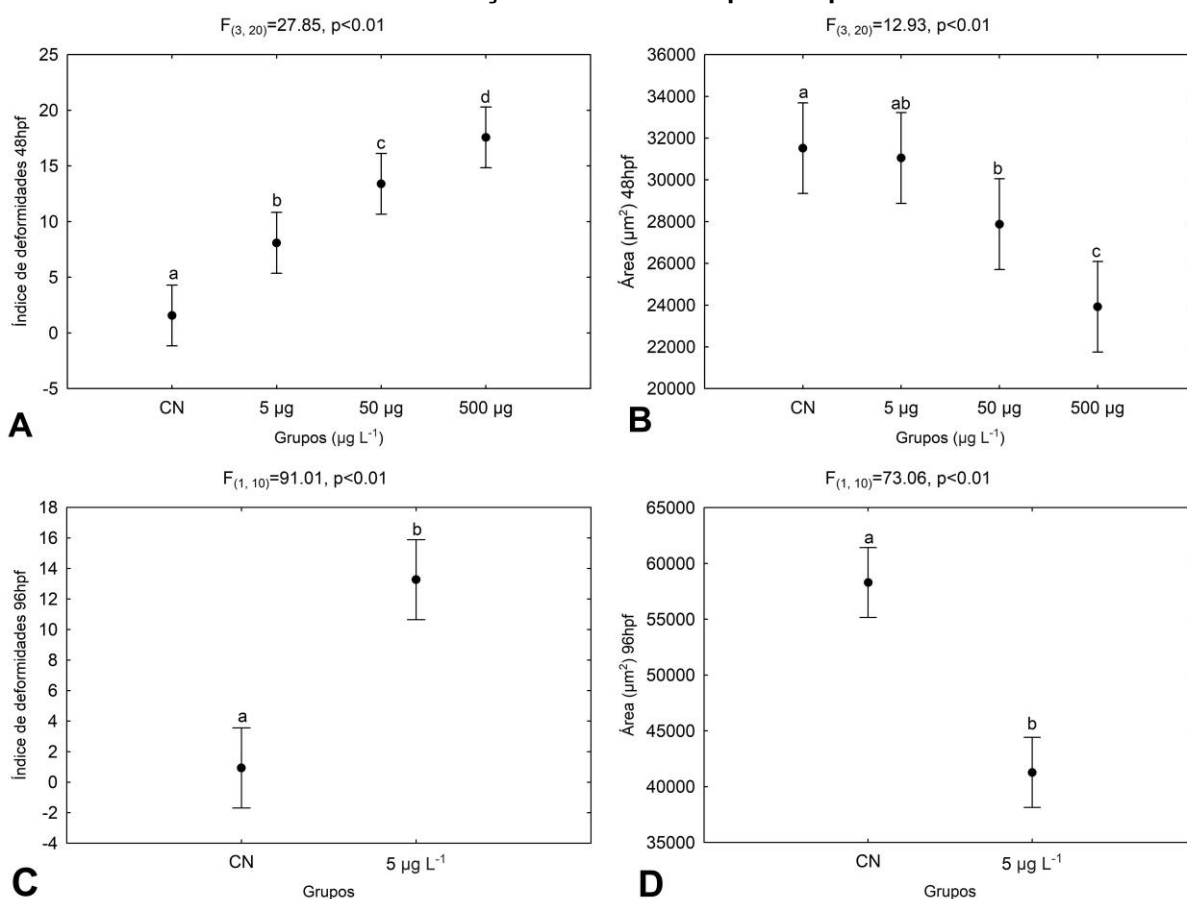
Com base nos resultados apresentados nos gráficos, observa-se que tanto os efeitos na área corporal quanto no índice de deformidades foram intensificados com o passar do tempo. Embora as deformidades tenham apresentado resultados significativos em ambos os tempos, é possível observar um agravamento no último período avaliado.

A intensidade dos efeitos tóxicos do Cd e de outros metais depende da espécie que está sendo exposta e do estágio de desenvolvimento (DAS; KAR; PATRA, 2023; FERRO; FERRARI; EISSA, 2021). Nos peixes, as fases embrionária e larval são as mais sensíveis, onde a presença de metais pesados resulta em morte dos indivíduos mais sensíveis, retardo de desenvolvimento, ocasionado pela alta demanda de energia proveniente da intensa atividade de divisão e diferenciação celular, inerente desta fase de desenvolvimento, somada a demanda extra de energia oriunda dos processos de detoxificação e reparo (SFAKIANAKIS *et al.*, 2015; TASLIMA *et al.*, 2022). A combinação exerce forte impacto na sobrevivência, como já observado, assim como na presença de deformidades (SFAKIANAKIS *et al.*, 2015).

A exposição ao Cd pode desencadear o estresse oxidativo e, consequentemente causar alterações no padrão de transcrição de genes relacionados a detoxificação (DAS; KAR; PATRA, 2023), além de interferir em genes reguladores de desenvolvimento embrionário e formação corporal (AZIMYCHETABI *et al.*, 2021). A elevada frequência de deformidades observadas no presente estudo

pode estar associada à interferência nos genes *Hox*, os quais desempenham um papel crucial no desenvolvimento morfológico embrionário, sendo responsáveis pelo eixo anteroposterior (rombencéfalo até a cauda) e pela formação das nadadeiras (MONTAVON; SOSHIKOVA, 2014; OZERNYUK; SCHEPETOV, 2022). Além disso, o Cd pode ter influenciado na expressão dos genes *POLR1C* e *LMNA*, responsáveis pela formação craniofacial (HARRINGTON, 2017). Já a frequente ausência de olhos nas larvas pode estar relacionada a alterações no gene *SOX2* associado à ausência ou tamanho reduzido do globo ocular (SLAVOTINEK, 2011).

Gráfico 15 – Índice de deformidades e área corporal das larvas de *R. quelen* expostas a concentrações de Cd em 48hpf e 96hpf



A) Índice de deformidades em 48hpf. B) Área corporal em 48hpf. C) Índice de deformidades em 96hpf. D) Área corporal em 96hpf. As letras sob as barras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Fisher

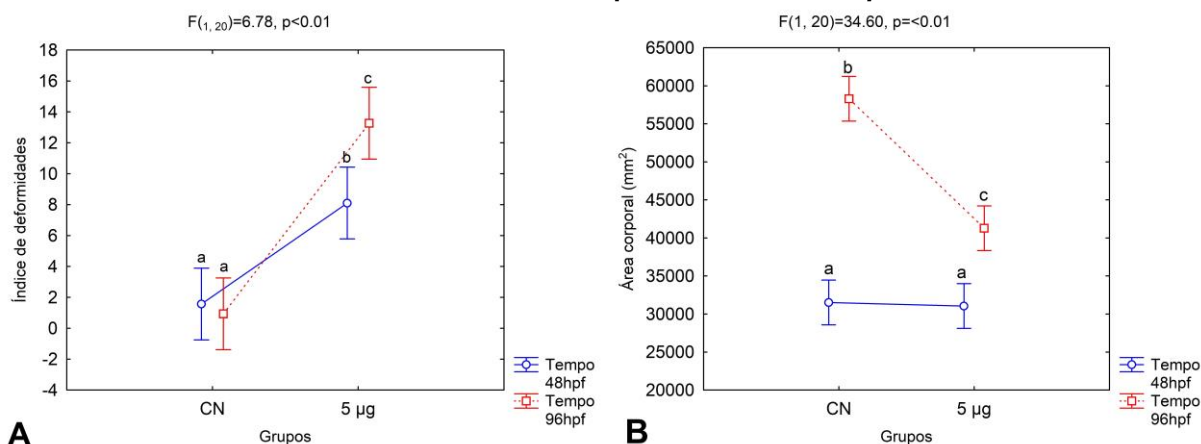
Fonte: Autoria própria (2023)

Por meio da ANOVA bifatorial observou-se que o índice de deformidades apresentou interação significativa entre os fatores “grupos” (concentração testada) e “tempo de exposição” (Gráfico 16 A). De acordo com os dados apresentados no respectivo gráfico, o controle negativo não apresentou alterações significativas do

índice de deformidades ao longo do tempo de exposição, diferentemente da concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, a qual diferiu estatisticamente do grupo controle e ocasionou grandes alterações do índice de deformidades em função da concentração testada como também pelo tempo de exposição, ou seja, com o passar do tempo a severidade das deformidades aumentou.

Analisando a área corporal das larvas expostas à concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, também se observou uma interação estatisticamente significativa entre os fatores “grupos” (concentração testada) e “tempo de exposição”. A área corporal das larvas que inicialmente em 48hpf não havia diferido do controle negativo, com o passar do tempo apresentou diferenças bastante expressivas em função da concentração de Cd, como também em função do tempo de exposição (Gráfico 16 B), sendo assim, o desenvolvimento foi seriamente afetado pela exposição ao Cd com o passar dos dias.

Gráfico 16 – Efeitos da interação entre a concentração de Cd e o tempo de exposição no índice de deformidades e área corporal das larvas *R. quelen*



A) Índice de deformidades em relação aos grupos avaliados e tempos de exposição. B) Área corporal em relação aos grupos avaliados e tempos de exposição. As letras sob as barras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Fisher

Fonte: Autoria própria (2023)

Efeitos semelhantes foram observados no estudo desenvolvido por Paul e Small (2021), no qual o crescimento foi significativamente comprometido em peixes expostos ao Cd, apresentando redução do comprimento e o peso dos indivíduos. Segundo os autores, a redução do crescimento pode ser justificada pelo acúmulo de Cd nos tecidos e danos à fisiologia dos órgãos, pois concentrações de Cd geralmente são mais altas no fígado e rins.

Benaduce *et al.*, (2008) também avaliaram as deformidades morfológicas e o crescimento de larvas de *R. quelen* expostas à 0.5, 4.5, 8 e 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em dois níveis de alcalinidade (63 e 92 mg/L CaCO_3), no qual as maiores concentrações provocaram danos morfológicos significativos no período de 3 a 7 dias de exposição, principalmente deformidades no barbilhão e na coluna espinhal. O comprimento, biomassa, peso, espessura da camada membranosa e altura da cabeça também foram reduzidos proporcionalmente ao aumento das concentrações de Cd. No respectivo estudo, as deformidades estiveram presentes em 100% dos indivíduos expostos às maiores concentrações de Cd, em água de menor alcalinidade.

A ocorrência de deformidades (teratogenicidade) compromete diretamente a sobrevivência dos peixes, devido às limitações na alimentação e no desempenho natatório, o que os tornam presas fáceis aos predadores (FEY; GRESZKIEWICZ; LEJK, 2022). Na espécie *R. quelen*, a exposição da fase larval ao Cd comumente ocasiona deformidades na coluna vertebral (TASLIMA *et al.*, 2022) o que afeta sua capacidade natatória, tendo esse efeito também sido observado no presente estudo. Ainda, na literatura é documentado que baixas concentrações de Cd são nocivas para outros organismos vertebrados aquáticos, como por exemplo girinos, em que a exposição a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd resultou em retardo da metamorfose e redução do crescimento (YA *et al.*, 2021).

Todos esses relatos evidenciam os riscos potenciais do Cd, mesmo em baixas concentrações, ao desenvolvimento e viabilidade populacional das espécies em ambientes aquáticos. A presença de Cd pode representar uma ameaça à biodiversidade e, conseqüentemente ao equilíbrio ecossistêmico, considerando que cada espécie desempenha uma importante e específica função em seu habitat, como também na cadeia alimentar. Além disso, por ser bioacumulativo e não biodegradável, a presença de Cd nos ambientes aquáticos provoca impactos a longo prazo, podendo se tornar um grande problema de saúde pública. Portanto, é indispensável o desenvolvimento de medidas que visem mitigar a deposição desse metal nesses ambientes.

5.4 Conclusão

A sobrevivência, o índice de deformidades e o tamanho das larvas foram drasticamente afetados pela exposição a todas as concentrações de Cd, inclusive

pela mais baixa. Dessa forma, conclui-se que as concentrações permissivas e realísticas de Cd apresentaram efeitos severos sobre as fases iniciais da espécie, representando um risco elevado à manutenção das populações naturais em caso de biodisponibilidade.

Os peixes em estágios iniciais de desenvolvimento são vitais para a manutenção das espécies e do equilíbrio dos ecossistemas naturais. Por ser uma fase extremamente sensível aos efeitos de poluentes, a presença de contaminantes em ambientes aquáticos, como o Cd, pode comprometer seu desenvolvimento e inviabilizar a sobrevivência.

Além disso, por meio do presente estudo pôde-se reafirmar o elevado potencial tóxico e teratogênico do Cádmio, como também a sensibilidade da espécie *Rhamdia quelen*, a qual respondeu a baixas concentrações do metal a um curto período de exposição.

6. CONCLUSÃO GERAL

A revisão cienciométrica mostrou que a toxicidade do Cd é um assunto bastante relevante e de grande interesse da comunidade científica, tendo em vista o grande volume de publicações, os quais são observados até nos dias atuais, como também os distintos bioindicadores utilizados em bioensaios e no biomonitoramento ambiental. Por meio do teste *Allium cepa*, constatou-se o potencial bioacumulativo, fitotóxico e genotóxico do respectivo metal, sendo observados efeitos em todas as concentrações testadas, com uma tendência da menor concentração ($5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd) em intensificar os danos.

Todas as concentrações avaliadas exerceram impactos no desenvolvimento da espécie *Rhamdia quelen*, os quais foram agravados conforme o aumento do tempo de exposição, reduzindo severamente a sobrevivência e provocando danos morfológicos e morfométricos bastante expressivos, principalmente nas concentrações de 50 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd. A elevada mortalidade, bem como a grande ocorrência de deformidades morfológicas, reforça que a fase embrio-larval é um período extremamente sensível, o que pode ser justificado devido à imaturidade do desenvolvimento de tecidos e órgãos. Além disso, é uma fase crucial para a manutenção das populações nos ecossistemas naturais e o Cd pode comprometer a viabilidade das espécies.

Os efeitos bastante significativos observados na concentração permissiva ($5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd) e na realística ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd) pode representar um sério risco às comunidades aquáticas como também para a saúde humana, considerando seu potencial bioacumulativo. Com base nos resultados da concentração estimada visando uma perspectiva futura ($500 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd), estima-se que essa concentração poderá extinguir a espécie, caso biodisponível. Além disso, observou-se que na literatura geralmente são encontrados estudos que avaliam concentrações elevadas de Cd, deixando uma lacuna a respeito dos efeitos provocados por concentrações ambientalmente relevantes.

Considerando que ambientes aquáticos de água doce em áreas sob influência agrícola apresentam concentrações de Cd que podem ultrapassar $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e que o respectivo metal pode ser bioacumulado pelas plantas, atingindo níveis tróficos subsequentes, sugere-se a necessidade do desenvolvimento de métodos para remediação e redução de sua biodisponibilidade em áreas de influência agrícola.

REFERÊNCIAS

- ABARIKWU, S. O. *et al.* Biomarkers of oxidative stress and health risk assessment of heavy metal contaminated aquatic and terrestrial organisms by oil extraction industry in Ogale, Nigeria. **Chemosphere**, v. 185, 2017.
- ADHISH, M.; MANJUBALA, I. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases - a review of models. **Heliyon** v. 9, e14557, 2023.
- AGATHOKLEOUS, E.; LIU, C.-J.; CALABRESE, E. J. Applications of the hormesis concept in soil and environmental health research. **Soil & Environmental Health**, v. 1, n. 1, p. 100003, 2023.
- ALONSO, E. *et al.* Bioaccumulation assessment via an adapted multi-species soil system (MS-3) and its application using cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 4, p. 1038–1044, 2009.
- ALVAREZ-VÁZQUEZ L. J. *et al.* Análise matemática e controle ótimo de técnicas de fitorremediação de metais pesados. **Modelagem Matemática Aplicada** 73: p. 387-400, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apm.2019.04.011>>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- ANDRESEN, E. *et al.* Sublethal and lethal Cd toxicity in soybean roots specifically affects the metabolome, Cd binding to proteins and cellular distribution of Cd. **Journal of Hazardous Materials**, v. 442, p. 130062, 2023.
- ANGELIN, E. M. *et al.* The multi-analytical in situ analysis of cadmium-based pigments in plastics. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105004, 2020.
- ANWAR, S. *et al.* Effect of cadmium stress on seed germination, plant growth and hydrolyzing enzymes activities in mungbean seedlings. **Journal of Seed Science**, v. 43, e202143042, 2021.
- ARIA, M.; CUCCURULLO, C. Bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of Informetrics**. V. 11, p. 959 - 975, 2017.
- AYANDA, O.I.; BELLO, O.A.; NWABUISI, O.I. Trace metal toxicity in some food items in three major markets in Ado-Odo/Ota LGA, Ogun State, Nigeria and associated health implications. **African Health Sciences**. p. 2050-2061, 2020.
- AZEVEDO-LINHARES, M. *et al.* Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 311–319, 2018.
- AZIMYCHETABI, Z. *et al.* Cadmium stress alters the essential oil composition and the expression of genes involved in their synthesis in peppermint (*Mentha piperita* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113602, 2021.
- BABA, H. *et al.* The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. **Modern Pathology**, v. 26, n. 9, p. 1228–

1234, 2013.

BANERJEE, R. *et al.* Cadmium selenide (CdSe) quantum dots cause genotoxicity and oxidative stress in *Allium cepa* plants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 865, p. 503338, 2021.

BARAKAT, M. A. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 361–377, 2011.

BARRETO, L. S. *et al.* Urban effluents affect the early development stages of Brazilian fish species with implications for their population dynamics. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 188, p. 109907, 2020.

BENADUCE, A. P. S. *et al.* Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 54, p. 274-282, 2008.

BEZERRA, V. *et al.* Can *Lemna minor* mitigate the effects of cadmium and nickel exposure in a Neotropical fish?. **Environmental Toxicology Pharmacology**. v. 92, 103862, 2022.

BHARTI, R. *et al.* Effect of heavy metals: An overview. **Materials Today: Proceedings**, v. 51, p. 880-885, 2022.

BHAT, S. A. *et al.* Biomonitoring of genotoxicity of industrial wastes using plant bioassays. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, p. 207–216, 2019.

BISSON, A. A. **Potenciais efeitos tóxicos do cádmio em rim de *Rhamdia quelen* (Pisces, Teleostei)**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Curso de Graduação em Biomedicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/1884/69678>>. Acesso em: 17 jul. de 2023

BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251–1257, 2006.

BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

BORGÃ, K. Ecotoxicology: Bioaccumulation. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. 2013.

BORSOI, A. *et al.* Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 3, n. 1, p. 86–100, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i1.9650>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

BRASIL. Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, **Ministério da Saúde**. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETEMBRO_2017.pdf> Acesso em: 24 jul. de 2023.

BRASIL. Portaria GM/MS Nº 888 de 4 de maio de 2021, **Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html> Acesso em: 24 jul. de 2023.

BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011, **Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em: 01 maio. de 2021

BRASIL. Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2009. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/a/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>>. Acesso em: 28 jul. de 2023.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 **CONAMA**. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Disponível em: <<http://conama.mma.gov.br/atos-normativos-sistema>>. Acesso em: 01 maio de 2021

BRASIL. Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008, **CONAMA**. Publicada no DOU nº 066, de 07/04/2008, págs. 64-68. Disponível em: <<http://conama.mma.gov.br/atos-normativos-sistema>>. Acesso em: 24 jul. de 2023

BRITO, I. A. *et al.* Embryo toxicity assay in the fish species *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptaridae) to assess water quality in the Upper Iguaçu Basin (Paraná, Brazil). **Chemosphere**, v. 208, p. 207-218, 2018.

BWAPWA, J. K.; JAIYEOLA, A. T.; CHETTY, R. Bioremediation of acid mine drainage using algae strains: A review. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 62-70, 2017.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. Hormesis and plant biology. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 42–48, 2009.

CAMPRA, M., RIVA, P., ORICCHIO, G., BRESCIA, V. Bibliometrix analysis of medical tourism. **Health Services Management Research**, v. 35, n. 3, p. 172-188, 2022.

CANO-ROCA BAYERA, O. *et al.* An integrated biomarker approach: Non-monotonic responses to cadmium exposure in the suckermouth catfish *Hypostomus plecostomus*. **Aquatic Toxicology**, v. 248, p. 106193, 2022.

CARNE, G. *et al.* Mass balance approach to assess the impact of cadmium decrease in mineral phosphate fertilizers on health risk: The case-study of French agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v. 760, p. 143-374, 2021.

CARVALHO, M. E. A. *et al.* Neutral-to-positive cadmium effects on germination and seedling vigor, with and without seed priming. **Journal of Hazardous Materials**, v. 448, p. 130813, 2023.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C.; AZEVEDO, R. A. Hormesis in plants under Cd exposure: From toxic to beneficial element? **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121434, 2020.

CARVALHO, S. S. *et al.* Presença de cádmio e ferro em amostras da água da sub-bacia hidrográfica do rio Siriri, Estado de Sergipe. In: **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 22., 2017, Florianópolis. Anais... Porto Alegre: Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2017., 2017. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1085114>> Acesso em: 28 out. 2020.

CHEN, C. Searching for intellectual turning points: Progressive knowledge domain visualization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. suppl_1, p. 5303-5310, 2004.

CHEN, C. CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature. **Journal of the American Society for Information Science and Technology**. V. 57(3): p. 359-377, 2006.

CHEN, C. **CiteSpace: A Practical Guide for Mapping Scientific Literature**. Nova Editora. ISBN: 978-1-53610-280-2, 2016.

CHEN, C.; IBEKWE-SANJUAN, F.; HOU, J. The structure and dynamics of cocitation clusters: A multiple-perspective cocitation analysis. **Journal of the American Society for information Science and Technology**, v. 61, n. 7, p. 1386-1409, 2010.

CHEN, K. *et al.* Assess heavy metals-induced oxidative stress of microalgae by Electro-Raman combined technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 1208, p. 339791, 2022.

CHEN, X. *et al.* Cadmium bioaccumulation and distribution in the freshwater bivalve *Anodonta woodiana* exposed to environmentally relevant Cd levels. **Science of The Total Environment**, p. 148289, 2021.

CHENG, C.-H. *et al.* Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in the mud crab (*Scylla paramamosain*) induced by cadmium exposure. **Chemosphere**, v. 263, p. 128277, 2021.

CLÉMENT, B. JP; DELHAYE, H. L.; TRIFFAULT-BOUCHET, G. G. Comparison of laboratory batch and flow-through microcosm bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 108, p. 217-223, 2014.

CUYPERS, A. *et al.* Cadmium-induced oxidative stress responses and acclimation in plants require fine-tuning of redox biology at subcellular level. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 199, p. 81-96, 2023.

DA COSTA ARAÚJO, A. P.; DE ANDRADE VIEIRA, J. E.; MALAFAIA, G. Toxicity and trophic transfer of polyethylene microplastics from *Poecilia reticulata* to *Danio rerio*. **Science of The Total Environment**, v. 742, p. 140-217, 2020.

DAS, S.; KAR, I.; PATRA, A. K. Cadmium induced bioaccumulation, histopathology, gene regulation in fish and its amelioration – a review. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, p. 127202, 2023.

DE CASTILHOS GHISI, N. *et al.* Glyphosate and its toxicology: A scientometric review. **Science of the Total Environment**, v. 733, p. 139359, 2020.

DENG, G. *et al.* Exposure to cadmium causes declines in growth and photosynthesis in the endangered aquatic fern (*Ceratopteris pteridoides*). **Aquatic Botany**, v. 112, p. 23-32, 2014.

DONOVAN, P.; SMITH, G. Mutagenicity of N-ethyl-N-nitrosourea, N-methyl-N-nitrosourea, methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in the developing Syrian hamster fetus. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1–2, p. 55–57, 2010.

DRUART, C.; SCHEIFLER, R.; DE VAUFLEURY, A. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, n. 1-3, p. 26-33, 2010.

DUAN, Y. *et al.* Toxic effects of cadmium and lead exposure on intestinal histology, oxidative stress response, and microbial community of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 167, p. 112220, 2021.

DUARTE, G. S. C. *et al.* Acanthocephalans parasites of two Characiformes fishes as bioindicators of cadmium contamination in two neotropical rivers in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 738, p. 140339, 2020.

DUTTA, M. *et al.* Assessment of bioaccumulation and detoxification of cadmium in soil-plant-insect food chain. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100242, 2019.

ELANGO, D. *et al.* Agronomic, breeding, and biotechnological interventions to mitigate heavy metal toxicity problems in agriculture. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 10, p. 100374, 2022.

EROFEEVA, E. A. Hormesis in plants: Its common occurrence across stresses. **Current Opinion in Toxicology**, v. 30, p. 100333, 2022.

ESCOBEDO MONDRAGÓN, M. *et al.* Trophic behavior of inorganic elements in nesting sea turtles (*Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, and *Caretta caretta*) in Quintana Roo: Biomagnification and biodilution effect in blood and scute tissues. **Marine Pollution Bulletin**, v. 187, p. 114582, 2023.

ESTADOS UNIDOS. National Primary Drinking Water Regulations. **Environmental Protection Agency (EUAEP)**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water->

and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>. Acesso em: 13 jun. de 2023.

FABRIN, T. M. C. *et al.* Performance of biomarkers metallothionein and ethoxyresorufin O-deethylase in aquatic environments: A meta-analytic approach. **Chemosphere**, v. 205, p. 339-349, 2018.

FAN, P. *et al.* Physiological and molecular mechanisms of medicinal plants in response to cadmium stress: Current status and future perspective. **Journal of Hazardous Materials**, v. 450, p. 131008, 2023.

FARIA, M. S. *et al.* In situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to biomonitor metal pollution in rivers and to evaluate the efficiency of restoration measures in mine areas. **Environmental pollution**, v. 151, n. 1, p. 213-221, 2008.

FASAE, K. D.; ABOLAJI, A. O. Interactions and toxicity of non-essential heavy metals (Cd, Pb and Hg): lessons from *Drosophila melanogaster*. **Current Opinion in Insect Science**, v. 51, p. 100900, 2022.

FATTAHI, B. *et al.* Effects of cadmium and lead on seed germination, morphological traits, and essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111584, 2019.

FERNANDES, T. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERRO, J. P.; FERRARI, L.; EISSA, B. L. Acute toxicity of cadmium to freshwater fishes and its relationship with body size and respiratory strategy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 248, p. 109109, 2021.

FEY, D. P.; GRESZKIEWICZ, M.; LEJK, A. M. Stress induced by substantial skeletal deformities in pike fry is not reflected in otolith fluctuating asymmetry: An experiment and literature review. **Fisheries Research**, v. 254, p. 106387, 2022.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>>.
Acesso em: 17 jul. de 2023.

FROUZ, J. *et al.* Can laboratory toxicity tests explain the pattern of field communities of algae, plants, and invertebrates along a toxicity gradient of post-mining sites?. **Applied Soil Ecology**, v. 51, p. 114-121, 2011.

GALLEGO-RÍOS, S. E.; PEÑUELA, G. A.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E. Updating the use of biochemical biomarkers in fish for the evaluation of alterations produced by pharmaceutical products. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 103756, 2021.

GAO, P. *et al.* Effects of nearly four decades of long-term fertilization on the availability, fraction and environmental risk of cadmium and arsenic in red soils. **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113097, 2021.

GAUTHIER, P. T. *et al.* Metal–PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 253–269, 2014.

GENCHI, G. *et al.* The effects of cadmium toxicity. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 11, p. 3782, 2020.

GENTÈS, S. *et al.* Application of the European Water Framework Directive: Identification of reference sites and bioindicator fish species for mercury in tropical freshwater ecosystems (French Guiana). **Ecological Indicators**, v. 106, p. 105468, 2019.

GHOSH, S. *et al.* Cadmium bioaccumulation in *Lamellidens marginalis* and human health risk assessment: A case study in India. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 26, n. 3, p. 713-725, 2020.

GHOSH, S.; MAL, M.; MANDAL, S. A dynamic model of cadmium bioaccumulation in *Lamellidens marginalis*, an edible shellfish in India. **Ecological Modelling**, v. 419, p. 108957, 2020.

GHUGE, S. A. *et al.* Comprehensive mechanisms of heavy metal toxicity in plants, detoxification, and remediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 450, p. 131039, 2023.

GOLIN, N. *et al.* Organic and inorganic pollutants in Jordão and Iguaçu rivers southern Brazil impact early phases of *Rhamdia quelen* and represent a risk for population. **Chemosphere**, v. 303, p. 134989, 2022.

GOMES, L. C. *et al.* Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100029>>. Acesso em: 29 abr. de 2021.

GOMES, M. F. *et al.* Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. **Chemosphere**, v. 263, p. 127985, 2021.

GROOT, G. S. *et al.* Large-scale monoculture reduces honey yield: the case of soybean expansion in Argentina. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 306, p. 107203, 2021.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: FUNPEC, 2002. 131 p. Disponível em: http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/_uploads/documentos-pessoais/documento-pessoal_52172.pdf. Acesso em: 06 jun. 2023.

GUI, Y. *et al.* From pond to table: Differences in breeding and consumption affect the balance between dietary risk of residual cadmium and uptake benefits of nutrients in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Food Chemistry**, v. 373, p. 131339, 2022.

GUO, S. N. *et al.* Immunosuppressive effects and associated compensatory responses in zebrafish after full life-cycle exposure to environmentally relevant concentrations of cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 188, p. 64–71, 2017.

HAIDER, F. U. *et al.* Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p. 111887, 2021.

HARRINGTON, B. Morphometrics, craniofacial disease genes, and the quest for the genetic basis of facial morphology. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 6, p. e59–e61, 2017.

HAS-SCHÖN, E. *et al.* Distribution and age-related bioaccumulation of lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd), and arsenic (As) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) and European catfish (*Sylurus glanis*) from the Buško Blato reservoir (Bosnia and Herzegovina). **Chemosphere**, v. 135, p. 289-296, 2015.

HAYAT, M. T. *et al.* Environmental hazards of cadmium: past, present, and future. In: **Cadmium toxicity and tolerance in plants**. Academic Press, 2019. p. 163-183.

HIRSCH, J. E. An index to quantify an individual's scientific research output. **Proceedings of the National academy of Sciences**, v. 102, n. 46, p. 16569-16572, 2005.

HONG, X.; ZHA, J. Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. **Science of the total environment**, v. 686, p. 311-321, 2019.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090–2095, 2009.

HU, F. *et al.* Effects of long-term cadmium exposure on growth, antioxidant defense and DNA methylation in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, v. 241, p. 106014, 2021.

HUA, X. *et al.* Migration and distribution of cadmium in aquatic environment: The important role of natural biofilms. **Science of The Total Environment**, v. 670, p. 478–485, 2019.

INABA, T. *et al.* Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai–itai disease. **Toxicology Letters**, v. 159, n. 2, p. 192–201, 2005.

JAOUANI, K. *et al.* Cadmium effects on embryo growth of pea seeds during germination: Investigation of the mechanisms of interference of the heavy metal with protein mobilization-related factors. **Journal of Plant Physiology**, v. 226, p. 64–76, 2018.

JÄRUP, L.; ÅKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 201–208, 2009.

JAYAWARDENA, U. A.; WICKRAMASINGHE, D. D.; UDAGAMA, P. V. Cytogenotoxicity evaluation of a heavy metal mixture, detected in a polluted urban wetland: Micronucleus and comet induction in the Indian green frog (*Euphlyctis hexadactylus*) erythrocytes and the *Allium cepa* bioassay. **Chemosphere**, v. 277, p. 130278, 2021.

JEONG, H. *et al.* Heavy metals and metalloid in aquatic invertebrates: A review of single/mixed forms, combination with other pollutants, and environmental factors. **Marine Pollution Bulletin**, v. 191, p. 114959, 2023.

JIA, X.; PAN, Y.; ZHU, X. Salinization and heavy metal cadmium impair growth but have contrasting effects on defensive colony formation of *Scenedesmus obliquus*. **Science of The Total Environment**, v. 862, p. 160693, 2023.

JOMOVA, K. *et al.* Essential metals in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 367, p. 110173, 2022.

KADIM, M. K.; RISJANI, Y. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. **Emerging Contaminants**, v. 8, p. 195–205, 2022.

KAKADE, A. *et al.* Heavy metals (HMs) pollution in the aquatic environment: Role of probiotics and gut microbiota in HMs remediation. **Environmental Research**, v. 223, p. 115186, 2023.

KAMALI, M. *et al.* Scientometric analysis and scientific trends on biochar application as soil amendment. **Chemical Engineering Journal**, v. 395, p. 125128, 2020.

KASSA, B. A. Cytotoxicity and Genotoxicity evaluation of municipal wastewater discharged into the head of Blue Nile River using the *Allium Cepa* test. **Scientific African**, v. 13, p. e00911, 2021.

KESSABI, K. *et al.* Combined toxic effects of cadmium and environmental microplastics in *Aphanius fasciatus* (Pisces, Cyprinodontidae). **Marine Environmental Research**, v. 189, p. 106071, 2023.

KHALID, N. *et al.* Interactions and effects of microplastics with heavy metals in aquatic and terrestrial environments. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 118104, 2021.

KHAN, W. U. *et al.* A critical review of hazardous waste generation from textile industries and associated ecological impacts. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 100, n. 1, p. 100829, 2023.

KHATUN, J.; INTEKHAB, A.; DHAK, D. Effect of uncontrolled fertilization and heavy metal toxicity associated with arsenic(As), lead(Pb) and cadmium (Cd), and possible

remediation. **Toxicology**, v. 477, p. 153274, 2022.

KIRAN; BHARTI, R.; SHARMA, R. Effect of heavy metals: An overview. **Materials Today: Proceedings**, v. 51, p. 880-885, 2022.

KITAMURA, R. S. A. *et al.* Sublethal biochemical, histopathological and genotoxicological effects of short-term exposure to ciprofloxacin in catfish *Rhamdia quelen*. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118935, 2022.

KLEINBERG, J. Bursty and Hierarchical Structure in Streams. *Data Mining and Knowledge Discovery*, v. 7, p. 373-397, 2003.

KOLAROVA, N.; NAPIÓRKOWSKI, P. Trace elements in aquatic environment. Origin, distribution, assessment and toxicity effect for the aquatic biota. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 21, n. 4, p. 655-668, 2021.

KRAEMER, L. D.; CAMPBELL, P. G. C.; HARE, L. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). **Environmental Pollution**, v. 142, n. 2, p. 313-325, 2006.

KUBIER, A.; WILKIN, R. T.; PICHLER, T. Cadmium in soils and groundwater: A review. **Applied Geochemistry**, v. 108, p. 104388, 2019.

KUROBE, T. *et al.* Evaluation of water quality during successive severe drought years within Microcystis blooms using fish embryo toxicity tests for the San Francisco Estuary, California. **Science of The Total Environment**, v. 610–611, p. 1029–1037, 2018.

LAU, L. L. *et al.* Trace elements emission in iron ore sintering: A review. **Environmental Advances**, v. 6, p. 100123, 2021.

LAWAL, A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. **Cogent Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 1339841, 2017.

LEE, H. *et al.* Optimization of alginate bead size immobilized with *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* for nutrient removal. **Bioresource technology**, v. 302, p. 122891, 2020.

LEE, J.-W. *et al.* Review of cadmium toxicity effects on fish: Oxidative stress and immune responses. **Environmental Research**, p. 116600, 2023.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LEVAN, A. The effects of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>>
Acesso em: 17 jul. 2023.

LEWIS, C. *et al.* Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 696–703, 2018.

LI, C. *et al.* Heavy metal pollution in coastal wetlands: A systematic review of studies globally over the past three decades. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127312, 2022.

LI, J.; GOERLANDT, F.; RENIERS, G. An overview of scientometric mapping for the safety science community: Methods, tools, and framework. **Safety Science**, v. 134, p. 105093, 2021.

LI, Y. *et al.* Toxic effects of cadmium on the physiological and biochemical attributes of plants, and phytoremediation strategies: A review. **Environmental Pollution**, v. 325, p. 121433, 2023.

LIAO, R. *et al.* Cadmium isotope systematics for source apportionment in an urban–rural region. **Applied Geochemistry**, v. 137, p. 105196, 2022.

LIN, Q. *et al.* Cadmium mobility and health risk assessment in the soil-rice-human system using in vitro biaccessibility and in vivo bioavailability assay: Two year field experiment. **Science of The Total Environment**, v. 867, p. 161564, 2023.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LIU, H. *et al.* Sources, bioaccumulation, and toxicity mechanisms of cadmium in *Chlamys farreri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 453, p. 131395, 2023.

LIU, H.; TIAN, X.; JIANG, L. Sources, bioaccumulation, and toxicity mechanisms of cadmium in *Chlamys farreri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 453, p. 131395, 2023.

LIU, J.; QU, W.; KADIISKA, M. B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 209–214, 2009.

LIU, S. *et al.* The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 293–298, 2012.

LIU, X. H. *et al.* Effects of subchronic exposure to waterborne cadmium on H-P-I axis hormones and related genes in rare minnows (*Gobiocypris rarus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 202, p. 1–11, 2017.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine pollution bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

LU, H. *et al.* Cadmium-induced toxicity to amphibian tadpoles might be exacerbated by alkaline not acidic pH level. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 218, p. 112288, 2021.

LUNDIN *et al.* Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 12, p. 3799-3811, 2005.

MAHJOUB, M.; EL MAADOUDI, M.; SMIRI, Y. Trace metal concentrations in water and edible tissues of *Liza ramada* from the Northeastern Moroccan Mediterranean coast: Implications for health risk assessment. **Regional Studies in Marine Science**, v. 46, p. 101881, 2021.

MAR, S. S.; OKAZAKI, M. Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. **Microchemical Journal**, v. 104, p. 17–21, 2012.

MARQUES, N. C. S. *et al.* Drivers of change in tropical protected areas: Long-term monitoring of a Brazilian biodiversity hotspot. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 20, n. 2, p. 69–78, 2022.

MCDONALD, S.; CRESSWELL, T.; HASSELL, K. Bioaccumulation kinetics of cadmium and zinc in the freshwater decapod crustacean *Paratya australiensis* following multiple pulse exposures. **Science of The Total Environment**, v. 720, p. 137609, 2020.

MEENA, P.; JHA, V. Environmental change, changing biodiversity and infections – lessons for kidney health community. **Kidney International Reports**, 2023.

MENDES, A. M. S., *et al.* Impactos ambientais causados pelo uso de fertilizantes agrícolas. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2010. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/875492>>. Acesso em: 28 out. 2020.

MÉNDEZ-ARMENTA, M.; RIOS, C. Cadmium neurotoxicity. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 350-358, 2007.

MIKULA, K. *et al.* Controlled release micronutrient fertilizers for precision agriculture—A review. **Science of the Total Environment**, v. 712, p. 136365, 2020.

MIRANDA, L. S. *et al.* Water-sediment interactions and mobility of heavy metals in aquatic environments. **Water Research**, v. 202, p. 117386, 2021.

MONA, C. *et al.* Considerations for bioaccumulation studies in fish with nanomaterials. **Chemosphere**, v. 312, p. 137299, 2023.

MONTAVON, T.; SOSHNIKOVA, N. Hox gene regulation and timing in embryogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 34, p. 76–84, 2014.

MUSHAK, P. Temporal stability of chemical hormesis (CH): Is CH just a temporary stop on the road to thresholds and toxic responses? **Science of The Total Environment**, v. 569–570, p. 1446–1456, 2016.

MUSTAFA, H. M.; HAYDER, G. Recent studies on applications of aquatic weed plants in phytoremediation of wastewater: A review article. **Ain Shams Engineering Journal**, v. 12, n. 1, p. 355-365, 2021.

NAGAMATSU, P. C. *et al.* Post hatching stages of tropical catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) are affected by combined toxic metals exposure with risk to population. **Chemosphere**, v. 277, p. 130199, 2021.

NAGEL, A. H. *et al.* Chronic toxicity of waterborne thallium to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115776, 2021.

NAIDU, R. *et al.* Chapter 3 Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. **Developments in Soil Science**, v. 32, n. C, p. 39–51, 2008.

NAN, G. *et al.* Mechanisms of cadmium accumulation (adsorption and absorption) by the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* under hydrodynamic conditions. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 550–558, 2016.

NASSER, F.; LYNCH, I. Updating traditional regulatory tests for use with novel materials: Nanomaterial toxicity testing with *Daphnia magna*. **Safety Science**, v. 118, p. 497-504, 2019.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C.; SÁ, O. R. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas-MG. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 11, n. 3, p. 227–232, 2009. Disponível em: <<https://periodicos.ufjf.br/index.php/zoociencias/article/view/24434>>. Acesso em: 29 abr. de 2021.

OECD. Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test; 2004.

OECD. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test; 2012.

OECD. GUID ELIN E FOR TESTIN G OF CHEMICALS. Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

OUYANG, W. *et al.* Heavy metal loss from agricultural watershed to aquatic system: A scientometrics review. **Science of the Total Environment**, v. 637, p. 208-220, 2018.

OZERNYUK, N.; SCHEPETOV, D. HOX-Gene Cluster Organization and Genome Duplications in Fishes and Mammals: Transcript Variant Distribution along the Anterior–Posterior Axis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9990, 2022.

PAITHANKAR, J. G. *et al.* Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. **Chemosphere**, v. 262, p. 128350, 2021.

PASCHOALINI, A. L.; BAZZOLI, N. Heavy metals affecting Neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. **Aquatic Toxicology**, v. 237, p. 105906, 2021.

PAUL, J. S.; SMALL, B. C. Chronic exposure to environmental cadmium affects growth and survival, cellular stress, and glucose metabolism in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquatic Toxicology**, v. 230, p. 105705, 2021.

PAUL, J. S.; SMALL, B. C. Exposure to environmentally relevant cadmium concentrations negatively impacts early life stages of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 216, p. 43-51, 2019.

PEERA SHEIKH KULSUM, P. G. *et al.* A state-of-the-art review on cadmium uptake, toxicity, and tolerance in rice: From physiological response to remediation process. **Environmental Research**, v. 220, p. 115098, 2023.

PEREIRA, C. R. *et al.* Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 1057-1063, 2006.

PÉREZ-ALVAREZ, I. *et al.* Protective effects of Spirulina (*Arthrospira maxima*) against toxicity induced by cadmium in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 248, p. 109099, 2021.

PERSCH, T. S. P. *et al.* Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. **Chemosphere**, v. 174, p. 98–109, 2017.

PERSOONE, G. *et al.* Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test—Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems**, n. 393, p. 01, 2009.

PERUSSOLO, M. C. *et al.* Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109438, 2019.

PIZZAIA, D. **Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-26042013-165343/en.php>>. Acesso em: 01 ago. de 2023.

PRAGNYA, M. *et al.* Bioaccumulation of heavy metals in different trophic levels of aquatic ecosystems with fish as a bioindicator in Visakhapatnam, India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, p. 112162, 2021.

POWERS, C. M. *et al.* Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and Teratology**, 33, 708–714, 2011.

PURI, M.; GANDHI, K.; KUMAR, M. S. Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations. **Journal of Environmental Management**, v. 332, p. 117344, 2023.

QAMOUCHE, K. *et al.* Radiological characterization of phosphate rocks, phosphogypsum, phosphoric acid and phosphate fertilizers in Morocco: An assessment of the radiological hazard impact on the environment. **Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 3234–3242, 2020.

QU, R.-J. *et al.* The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 95, p. 83-90, 2013.

RAHMAN, S. U. *et al.* State-of-the-art OMICS strategies against toxic effects of heavy metals in plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113952, 2022.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. **Environmental pollution**, v. 120, n. 3, p. 497-507, 2002.

RAINBOW, P. S. *et al.* Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals. **Marine Ecology Progress Series**, v. 183, p. 189-203, 1999.

RAJENDRAN, S. *et al.* A critical and recent developments on adsorption technique for removal of heavy metals from wastewater-A review. **Chemosphere**, v. 303, p. 135146, 2022.

REICHSTÄDTER, M. *et al.* Simultaneous determination of mercury, cadmium and lead in fish sauce using Diffusive Gradients in Thin-films technique. **Talanta**, v. 217, p. 121059, 2020.

RODRÍGUEZ, Y. A. *et al.* *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.

ROMERO-ESTÉVEZ, D.; YÁNEZ-JÁCOME, G. S.; NAVARRETE, H. Non-essential metal contamination in Ecuadorian agricultural production: A critical review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 104932, 2023.

RONG, Z.; WU, B. Scientific personnel reallocation and firm innovation: Evidence from China's college expansion. **Journal of Comparative Economics**, v. 48, n. 3, p. 709-728, 2020.

SABEEN, M. *et al.* *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation.

Saudi Journal of Biological Sciences, v. 27, n. 5, p. 1368–1374, 2020.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept.

Environmental Science and Pollution Research, v. 20, n. 5, p. 2721-2725,

SANTANA, M. S. *et al.* A meta-analytic review of fish antioxidant defense and biotransformation systems following pesticide exposure. **Chemosphere**, v. 291, p. 132730, 2022.

SELVI, M. T.; HUSSAIN, A. Z. An empirical analysis on the impact of metal contents on water quality. **Materials Today: Proceedings**, v. 59, p. 1349-1356, 2022.

SETH, C. S. *et al.* Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 711–716, 2008.

SFAKIANAKIS, D. G. *et al.* Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246–255, 2015.

SIERRA-MARQUEZ, L. *et al.* Effects of cadmium exposure on sperm and larvae of the neotropical fish *Prochilodus magdalenae*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 225, p. 108577, 2019.

SLAVOTINEK, A. M. Eye development genes and known syndromes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 104, n. 4, p. 448–456, 2011.

ŠÍROVÁ, K.; VACULÍK, M. Toxic effects of cadmium on growth of *Aloe ferox* Mill. **South African Journal of Botany**, v. 147, p. 1181-1187, 2022.

SODHI, K. K. *et al.* Perspective on the heavy metal pollution and recent remediation strategies. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100166, 2022.

SOLA, E. *et al.* Cadmium-induced neurotoxic effects on rat basal forebrain cholinergic system through thyroid hormones disruption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 103791, 2022.

SOLIMAN, M. M. *et al.* Trophic transfer of heavy metals along a pollution gradient in a terrestrial agro-industrial food web. **Geoderma**, v. 413, p. 115748, 2022.

SOMPRASONG, K.; ASSAWADITHALERD, M. Integrated spatial approaches for long-term monitoring of cadmium contamination caused by rainfall erosion: A case study of overland sediment in Mae Sot, Thailand. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 121, p. 102961, 2021.

SOUZA, I. R. *et al.* Visible-light reduced silver nanoparticles' toxicity in *Allium cepa* test system. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113551, 2020.

SOUZA, J. P. Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladócero (*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*). 2012.

SOUZA, M. C. O. *et al.* Recent trends in pesticides in crops: A critical review of the duality of risks-benefits and the Brazilian legislation issue. **Environmental Research**, p. 115811, 2023.

SOUZA, T. S. *et al.* The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1363–1368, 2009.

SU, T. *et al.* The feasibility of the zebrafish embryo as a promising alternative for acute toxicity test using various fish species: A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147705, 2021.

SUHANI, I. *et al.* Impact of cadmium pollution on food safety and human health. **Current Opinion in Toxicology**, v. 27, p. 1-7, 2021.

TAKARINA, N. D.; PURWIYANTO, A. I. S.; SUTEJA, Y. Cadmium (Cd), Copper (Cu), and Zinc (Zn) levels in commercial and non-commercial fishes in the Blanakan River Estuary, Indonesia: A preliminary study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, p. 112607, 2021.

TANG, K. H. D. Phytoremediation: Where do we go from here? **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102721, 2023.

TANG, Q. *et al.* Distribution and accumulation of cadmium in soil under wheat-cultivation system and human health risk assessment in coal mining area of China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 253, p. 114688, 2023.

TASLIMA, K. *et al.* Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish – A review. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 858–868, 2022.

TEMPLETON, D. M.; LIU, Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 267–275, 2010.

ULLAH, R.; MUHAMMAD, S. Heavy metals contamination in soils and plants along with the mafic-ultramafic complex (Ophiolites), Baluchistan, Pakistan: Evaluation for the risk and phytoremediation potential. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100931, 2020.

UNIÃO EUROPEIA. Directive (EU) 2020/2184 of 16 December 2020. **European Parliament and of the Council**. JO L 435 de 23/12/2020, p. 1–62. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj>>. Acesso em: 14 jun. de 2023.

VALLADOLID-GARNICA, D. E. *et al.* Distribution, bioaccumulation, and trace element transfer among trophic levels in the southeastern Gulf of California. **Marine Pollution Bulletin**, v. 194, p. 115290, 2023.

VIARENGO, A. *et al.* Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 6, p. R1612-R1619, 1999.

VICENTINI, M. *et al.* Effects of cadmium on the female reproductive axis of a Neotropical fish. **Chemosphere**, v. 286, p. 131639, 2022.

VIDAL, E. Efeito da amônia sobre a fertilização artificial de ovócitos e no desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae). 2012.

VIEIRA, L. R. *et al.* Toxicidade de cádmio em plantas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 19, p. 1574-1588, 2015.

VILLEN-GUZMAN, M. *et al.* Valorization of lemon peel waste as biosorbent for the simultaneous removal of nickel and cadmium from industrial effluents. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101380, 2021.

WAGH, M.S.; OSBORNE, W.J.; SIVARAJAN, S. Toxicity assessment of lead, nickel and cadmium on zebra fish augmented with *Bacillus xiamenensis* VITMSJ3: An insight on the defense mechanism against oxidative stress due to heavy metals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 177, p. 113830, 2023.

WANG, L.; LIU, Z. Keeping a clean research environment: Addressing research misconduct and improving scientific integrity in China. **Cancer letters**, v. 464, p. 1-4, 2019.

WANG, R. *et al.* Cadmium in food: Source, distribution and removal. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134666, 2023.

WANG, S.; LI, G. Assessment of cadmium bioaccumulation and distribution in the kernels of peanut widely cultivated in China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 23–28, 2014.

WANG, W.-X. Interactions of trace metals and different marine food chains. **Marine Ecology Progress Series**, v. 243, p. 295-309, 2002.

WANG, W.-X. Bioaccumulation and biomonitoring. **Marine Ecotoxicology**. Academic Press, 2016. p. 99-119.

WANG, X. *et al.* Elevated cadmium pollution since 1890s recorded by forest chronosequence in deglaciated region of Gongga, China. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 114082, 2020.

WATSON, G. J. *et al.* Detecting the effects of chronic metal exposure on benthic systems: Importance of biomarker and endpoint selection. **Aquatic Toxicology**, v. 230, p. 105674, 2021.

WEI, C. *et al.* Method on site-specific source apportionment of domestic soil pollution across China through public data mining: A case study on cadmium from non-ferrous industries. **Environmental Pollution**, v. 295, p. 118605, 2022.

WIECZOREK, J.; BARAN, A.; BUBAK, A. Mobility, bioaccumulation in plants, and risk assessment of metals in soils. **Science of The Total Environment**, v. 882, p. 163574, 2023.

XIONG, X.; YANG, G.-I.; GUAN, Z.-C. Estimating the multi-period efficiency of high-tech research institutes of the Chinese Academy of Sciences: A dynamic slacks-based measure. **Socio-Economic Planning Sciences**, v. 71, p. 100855, 2020.

XIONG, Y. *et al.* Zebrafish larvae acute toxicity test: A promising alternative to the fish acute toxicity test. **Aquatic Toxicology**, v. 246, p. 106143, 2022.

XU, Q. *et al.* Subcellular distribution and toxicity of cadmium in *Potamogeton crispus* L. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 114-120, 2012.

XU, X. *et al.* Bioaccumulation of 35 metal (loid) s in organs of a freshwater mussel (*Hyriopsis cumingii*) and environmental implications in Poyang Lake, China. **Chemosphere**, v. 307, p. 136150, 2022.

YA, J. *et al.* Cadmium induced skeletal underdevelopment, liver cell apoptosis and hepatic energy metabolism disorder in *Bufo gargarizans* larvae by disrupting thyroid hormone signaling. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p. 111957, 2021.

YANG, S. *et al.* Impacts of dissolved organic matter on the aggregation and photo-dissolution of cadmium pigment nanoparticles in aquatic systems. **Science of The Total Environment**, v. 865, p. 161313, 2023.

YUAN, Z. *et al.* Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. **Science of The Total Environment**, v. 676, p. 87–96, 2019.

ZAMORA-LEDEZMA, C. *et al.* Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. **Environmental Technology & Innovation**, v. 22, p. 101504, 2021.

ZHANG, B. *et al.* Translatomics and physiological analyses of the detoxification mechanism of green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to cadmium toxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 448, p. 130990, 2023.

ZHANG, C. *et al.* Cadmium-induced oxidative stress, metabolic dysfunction and metal bioaccumulation in adult palaemonid shrimp *Palaemon macrodactylus* (Rathbun, 1902). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111591, 2021.

ZHANG, H. *et al.* Distribution characteristics, bioaccumulation and trophic transfer of heavy metals in the food web of grassland ecosystems. **Chemosphere**, v. 278, p. 130407, 2021.

ZHANG, H.; REYNOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. **Science of The Total Environment**, v. 678, p. 761–767, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Multigenerational exposure of cadmium trans-generationally impairs locomotive and chemotactic behaviors in *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 325, p. 138432, 2023a.

ZHANG, J. *et al.* Hormesis in the heavy metal accumulator plant *Tillandsia ionantha* under Cd exposure: Frequency and function of different biomarkers. **Science of The Total Environment**, v. 889, p. 164328, 2023b.

ZHANG, M.-P.; WANG, M.; WANG, C. Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. **Biochimie**, v. 181, p. 1-11, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* The impact of land use changes and erosion process on heavy metal distribution in the hilly area of the Loess Plateau, China. **Science of The Total Environment**, v. 718, p. 137305, 2020.

ZHAO, X.; YANG, Z.; CHENG, Y. Effects of cadmium alone and in combination with pH on bioaccumulation, tissue structure, and enzyme activity of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 245, p. 109025, 2021.

ZHENG, J. L. *et al.* Effects of continuous and intermittent cadmium exposure on HPGL axis, GH/IGF axis and circadian rhythm signaling and their consequences on reproduction in female zebrafish: biomarkers independent of exposure regimes. **Chemosphere**, p. 130879, 2021.

ZHENG, X. *et al.* Review on fate and bioavailability of heavy metals during anaerobic digestion and composting of animal manure. **Waste Management**, v. 150, p. 75–89, 2022.

ZHOU, Q. *et al.* Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. **Global Ecology and Conservation**, v. 22, p. e00925, 2020.

ZULKERNAIN, N. H.; UVARAJAN, T.; NG, C. C. Roles and significance of chelating agents for potentially toxic elements (PTEs) phytoremediation in soil: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 341, p. 117926, 2023.

ZUYKOV, M.; PELLETIER, E.; HARPER, D. AT. Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 201-208, 2013.