

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS FRANCISCO BELTRÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL:
ANÁLISE E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ANNA GABRIELA DRUMMOND XAVIER TELES

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DAS ÁGUAS E DOS SEDIMENTOS DO RIO
CHOPIM NO REFÚGIO DE VIDA SILVESTRE DOS CAMPOS DE PALMAS,
PARANÁ E SEU ENTORNO**

FRANCISCO BELTRÃO – PR

2024

ANNA GABRIELA DRUMMOND XAVIER TELES

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DAS ÁGUAS E DOS SEDIMENTOS DO RIO
CHOPIM NO REFÚGIO DE VIDA SILVESTRE DOS CAMPOS DE PALMAS,
PARANÁ E SEU ENTORNO**

**Assessment of the ecotoxicity of the waters and sediments of the Chopim
River in Campos de Palmas Wildlife Refuge, Paraná and its surroundings**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Linha de Pesquisa: Análise Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Fernando César Manosso

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela Düsman

FRANCISCO BELTRÃO – PR

2024



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

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ANNA GABRIELA DRUMMOND XAVIER TELES

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DAS ÁGUAS E DOS SEDIMENTOS DO RIO CHOPIM NO
REFÚGIO DE VIDA SILVESTRE DOS CAMPOS DE PALMAS, PARANÁ E SEU ENTORNO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental: Análise E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área deconcentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 22 de Março de 2024

Dr. Fernando Cesar Manosso, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Alessandra Paim Berti, Doutorado - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (Uems)

Dra. Elisangela Dusman, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Ticiane Sauer Pokrywiecki, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 29/07/2024.

AGRADECIMENTOS

“A jornada de mil quilômetros começa com o primeiro passo”.

Não lembro ao certo quem me disse essa frase, mas lembro que foi por meados de 2015. E desde então ela vem perambulando na minha cabeça. A vida são os mil quilômetros. E todo dia nós damos um primeiro passo (ou tentamos).

Mas de qualquer forma, essa jornada nunca foi feita de forma solitária. Se em algum momento me vi sozinha, foi por pura cegueira, porque minha mãe, Maria Teresa, meu pai, Marco Junior e minhas irmãs Anna Carolina e Cecília, nunca me deixaram desamparada e sempre apoiaram as minhas ideias e loucuras. Por isso, esse trabalho eu dedico inteiramente a vocês. Obrigada por serem quem são e me fazerem ser quem sou. Sem vocês, não seria eu.

Agradeço também à minha professora favorita de toda essa jornada: Elisângela Düsman. Você não só foi, como é uma das minhas maiores inspirações como mulher, pesquisadora e professora. Obrigada por sempre ter me apoiado, compreendido e acreditado no meu potencial, além de nunca ter medido esforços para me ajudar no que fosse preciso. Se não fosse por você, eu não teria passado no segundo período da faculdade e jamais estaria aqui.

Agora, não menos importante, agradeço aos meus melhores amigos, que me fizeram acreditar que almas gêmeas nem sempre são românticas: Victor Hugo, Anderson e Andrey. Vocês, de longe, foram os que mais acompanharam essa caminhada de perto. Obrigada por nunca terem soltado a minha mão, mesmo nos momentos que mereci. Obrigada por cada sorriso, cada abraço, cada palavra de acalento e suporte. Vocês acreditaram em mim quando nem eu mesma acreditei.

E quero agradecer ao professor Fernando por ter aceitado ser meu orientador e, com toda a calma do mundo, ter me orientado. Agradeço também as professoras Ticiane e Alessandra, por terem aceito o convite para participar da minha banca e pelos conhecimentos compartilhados.

Sem vocês, esse trabalho e toda essa jornada não teria sido possível.

RESUMO

O Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP) é uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral, formada por propriedades privadas, onde atividades como agricultura e silvicultura são desenvolvidas. Essa UC abriga nascentes da bacia hidrográfica do Rio Chopim, importante fonte de abastecimento de água da região. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar os parâmetros físico-químicos e os teores de hormônios estrógenos, agroquímicos e metais nas amostras de águas e sedimentos do Rio Chopim, na região do RVS-CP. Além disso, utilizar diferentes bioindicadores, como *Artemia salina* L., pelo teste de imobilidade/mortalidade; *Eisenia fetida*, pelo teste de fuga, *Allium cepa* L., pelo teste de citotoxicidade e mutagenicidade; e células de fígado humano *in vitro*, pelo teste de citotoxicidade do MTT; para avaliar a qualidade das águas e dos sedimentos deste Rio. As amostras foram coletadas em sete pontos: N1, N2 e N3 (três nascentes dentro do RVS-CP), P1, P2 e P3 (pontos do Rio Chopim dentro do RVS-CP) e P4 (ponto fora do RVS-CP). Com relação aos resultados das amostras, os pontos N1 e N2 do Rio Chopim foram os pontos que mais apresentaram alterações em relação aos padrões legais. No ponto N1, as amostras de água apresentaram irregularidades nos parâmetros de oxigênio dissolvido e DBO₅, além da presença dos hormônios estrona e etinilestradiol. Os sedimentos continham níveis elevados de zinco e estavam contaminados por Tebuconazol, Tiametoxam, Trifloxistrobina e Carbendazim. Em termos de bioindicadores, *A. salina* indicou toxicidade no sedimento, e as células Huh7.5 mostraram citotoxicidade na água e nos sedimentos. No ponto N2, as amostras de água apresentaram valores fora dos padrões legais para cor e manganês, e a presença de estrona. Os sedimentos também mostraram níveis elevados de zinco e contaminação por Tebuconazol, Tiametoxam, Trifloxistrobina e Carbendazim, e *E. fetida* demonstrou comportamento de fuga tanto na água quanto nos sedimentos. Esses resultados sugerem que os pontos N1 e N2 são áreas com maiores anomalias em parâmetros físico-químicos, metais, agroquímicos, hormônios, e respostas adversas dos bioindicadores. Dessa forma, as conclusões dessa pesquisa ressaltam a relevância de empregar variados organismos na observação da qualidade do meio ambiente. Elas também sugerem a adoção de ações educacionais e preventivas no RVS-CP, visando mitigar os impactos tóxicos identificados e assegurar a preservação dessa UC e os recursos hídricos oriundos dela.

PALAVRAS-CHAVE: Agroquímicos; *Allium cepa* L.; *Artemia salina* L.; células HuH7.5; *Eisenia fetida* L.; Estrógenos; Metais.

ABSTRACT

The Campos de Palmas Wildlife Refuge (RVS-CP) is an Integral Protection Conservation Unit (UC), formed by private properties, where activities such as agriculture and forestry are developed. This UC is home to springs in the Chopim River basin, an important source of water supply in the region. Thus, the objective of the present work was to analyze the physicochemical parameters and the levels of estrogen hormones, agrochemicals and metals in water and sediment samples from the Chopim River, in the RVS-CP region. Furthermore, use different bioindicators, such as *Artemia salina* L., for the immobility/mortality test; *Eisenia fetida*, by the escape test, *Allium cepa* L., by the cytotoxicity and mutagenicity test; and human liver cells in vitro, using the MTT cytotoxicity test; to evaluate the quality of the waters and sediments of this River. The samples were collected at seven points: N1, N2 and N3 (three springs within the RVS-CP), P1, P2 and P3 (points of the Chopim River within the RVS-CP) and P4 (point outside the RVS-CP). Regarding the sample results, points N1 and N2 of the Chopim River were the points that showed the most abnormalities. At point N1, the water samples showed irregularities in the parameters of dissolved oxygen and BOD₅, in addition to the presence of the hormones estrone and ethinyl estradiol. The sediments contained high levels of zinc and were contaminated with Tebuconazole, Thiamethoxam, Trifloxystrobin and Carbendazim. In terms of bioindicators, *A. salina* indicated toxicity in sediment, and Huh7.5 cells showed cytotoxicity in both water and sediment. At point N2, the water samples showed non-standard values for color and manganese, and the presence of estrone. Sediments also showed elevated levels of zinc and contamination by Tebuconazole, Thiamethoxam, Trifloxystrobin and Carbendazim, and *E. fetida* demonstrated escape behavior in both water and sediment. These results suggest that points N1 and N2 are critical areas with more anomalies in physicochemical parameters, metals, agrochemicals, hormones, and adverse responses to bioindicators. Thus, the conclusions of this research highlight the relevance of employing different organisms in observing the quality of the environment. They also suggest the adoption of educational and preventive actions in the RVS-CP, aiming to mitigate the identified toxic impacts and ensure the preservation of this UC and the water resources arising from it.

KEYWORDS: Agrochemicals; *Allium cepa* L.; *Artemia salina* L.; HuH7.5 cells; *Eisenia fetida* L.; estrogens; metals.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Localização do Rio Chopim e limites do RVS-P..... | 35 |
| Figura 2 - Localização dos pontos de coleta de água e sedimento do Rio Chopim e limites do RVS-CP..... | 36 |
| Figura 3 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica da Nascente 1 (N1)..... | 38 |
| Figura 4 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica da Nascente 2 (N2)..... | 39 |
| Figura 5 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica da Nascente 3 (N3)..... | 40 |
| Figura 6 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica do Ponto 1 (P1)..... | 41 |
| Figura 7 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica do Ponto 2 (P2)..... | 42 |
| Figura 8 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica do Ponto 3 (P3)..... | 43 |
| Figura 9 – Taxa de sobrevivência das <i>A. salina</i> dos grupos controle e tratados com as amostras de água do Rio Chopim, pelo ensaio de imobilidade/mortalidade..... | 61 |
| Figura 10 – Taxa de sobrevivência das <i>A. salina</i> dos grupos controle e tratados com as amostras de sedimento do Rio Chopim, pelo ensaio de imobilidade/mortalidade..... | 62 |
| Figura 11 – Análise de componentes principais (PCA) das amostras de sedimento do Rio Chopim..... | 63 |
| Figura 12 – Número médio e desvio-padrão das <i>E. fetida</i> distribuídas nos solos controle (CO- e CO+) e nas amostras de água dos diferentes pontos do Rio Chopim..... | 64 |
| Figura 13 – Número médio e desvio-padrão das <i>E. fetida</i> distribuídas nos solos controle (CO- e CO+) e nas amostras de sedimentos dos diferentes pontos do Rio Chopim..... | 64 |
| Figura 14 – Taxa de fuga das <i>E. fetida</i> expostas as amostras de água do Rio Chopim..... | 65 |
| Figura 15 – Análise de componentes principais (PCA) das amostras de água do Rio Chopim..... | 66 |
| Figura 16 – Taxa de fuga das <i>E. fetida</i> expostas as amostras de sedimento do Rio Chopim..... | 67 |
| Figura 17 – Índices mitóticos (IM%) das <i>A. cepa</i> expostas as amostras de água do Rio Chopim..... | 68 |
| Figura 18 – Índices mitóticos (IM%) das <i>A. cepa</i> expostas as amostras de sedimento do Rio Chopim..... | 69 |
| Figura 19 – Índices de mutagenicidade (IMG%) das <i>A. cepa</i> expostas as amostras de águas do Rio Chopim..... | 70 |
| Figura 20 – Índices de mutagenicidade (IMG%) das <i>A. cepa</i> expostas as amostras de sedimentos do Rio Chopim..... | 71 |
| Figura 21 – Diferentes fases mitóticas de <i>A. cepa</i> expostas as amostras de água e sedimento do Rio Chopim..... | 71 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 22 – Absorbâncias médias de células HuH7.5 tratadas com as amostras de águas do Rio Chopim, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT..... | 76 |
| Figura 23 – Absorbâncias médias de células HuH7.5 tratadas com as amostras de. sedimentos do Rio Chopim, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT..... | 77 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de água e sedimento do Rio Chopim..... | 37 |
| Tabela 2 – Uso da terra (%) na área de contribuição hidrológica dos pontos de coleta das amostras de água e sedimento do Rio Chopim..... | 39 |
| Tabela 3 – Contribuição hidrológica dos pontos de coleta das amostras de água e sedimento do Rio Chopim..... | 44 |
| Tabela 4 – Análises físico-químicas das amostras de água do Rio Chopim no RVS-CP..... | 51 |
| Tabela 5 - Concentrações médias de metais das amostras de água (mg/L) e sedimentos (mg/kg) do Rio Chopim no RVS-CP..... | 56 |
| Tabela 6 – Agroquímicos detectados nas amostras de sedimento do Rio Chopim no RVS-CP..... | 59 |
| Tabela 7 – Concentrações (mg/L) de hormônios estrógenos detectados nas amostras de águas do Rio Chopim no RVS-CP..... | 60 |
| Tabela 8 – Tipos, números, total de alterações e índice de mutagenicidade (IMG%) obtidos para os grupos controle negativo (CO-), positivo (CO+) e branco (COB) e os grupos tratados com as amostras de águas e sedimentos do Rio Chopim..... | 73 |
| Tabela 9 – Percentual de viabilidade de células (VC) HuH7.5 tratadas com as amostras de água e sedimento do Rio Chopim por 24 h, 48 h e 72 h, pelo teste do MTT..... | 74 |

LISTA DE ABREVIações

| | |
|------------------|---|
| Al | Alumínio |
| ANA | Agência Nacional de Águas |
| Cd | Cádmio |
| CDB | Convenção da Diversidade Biológica |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| Cr | Cromo |
| Cu | Cobre |
| DBO ₅ | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DQO | Demanda Química de Oxigênio |
| E1 | Estrona |
| E2 | 17β-estradiol |
| E3 | Estriol |
| EE2 | 17α-etinilestradiol |
| ETE | Estração de Tratamento de Esgoto |
| Hg | Mercúrio |
| IM | Índice Mitótico |
| IMG | Índice de Mutagenicidade |
| IPCS | Programa Internacional de Segurança Química |
| Mn | Manganês |
| MN | Micronúcleo |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| N | Nitrogênio |
| OD | Oxigênio Dissolvido |
| P | Fósforo |
| Pb | Chumbo |
| PCA | Análise de Componentes Principais |
| PCR | Portaria de Consolidação |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| RVS-CP | Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas |
| SNUC | Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza |
| UC | Unidade de Conservação |
| UCPI | Unidades de Conservação de Proteção Integral |
| UCUS | UCUS Unidades de Conservação de Uso Sustentável |
| UNEP | Programa Ambiental das Nações Unidas |
| VC | Viabilidade Celular |
| Zn | Zinco |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 3.1 | UNIDADES DE CONSERVAÇÃO | 17 |
| 3.1.1 | Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas | 19 |
| 3.2 | PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUALIDADE DA ÁGUA | 21 |
| 3.3 | ANÁLISE DE METAIS PESADOS | 24 |
| 3.4 | ANÁLISE DE AGROQUÍMICOS | 25 |
| 3.5 | HORMÔNIOS | 27 |
| 3.6 | TESTES DE ECOTOXICIDADE | 28 |
| 3.6.1 | <i>Artemia salina</i> L. | 29 |
| 3.6.2 | <i>Eisenia fetida</i> L. | 30 |
| 3.6.3 | <i>Allium cepa</i> L. | 31 |
| 3.6.4 | Citotoxicidade <i>in vitro</i> | 33 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | ÁREA DE ESTUDO | 35 |
| 4.2 | PONTOS DE COLETA | 36 |
| 4.3 | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 44 |
| 4.4 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METAIS | 44 |
| 4.5 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AGROQUÍMICOS | 45 |
| 4.6 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS | 45 |
| 4.7 | TESTES DE ECOTOXICIDADE | 45 |
| 4.7.1 | Preparo das amostras | 45 |
| 4.7.2 | Teste de imobilidade/mortalidade com <i>A. salina</i> | 46 |
| 4.7.3 | Teste de fuga com <i>E. fetida</i> | 46 |
| 4.7.4 | Teste de citotoxicidade e mutagenicidade com <i>A. cepa</i> | 48 |
| 4.7.5 | Teste de citotoxicidade do MTT com células de fígado humano | 49 |
| 4.8 | ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) | 50 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |

| | | |
|----------|-----------------------------------|-----------|
| 5.1 | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 51 |
| 5.2 | ANÁLISE DE METAIS | 55 |
| 5.3 | AGROQUÍMICOS | 57 |
| 5.4 | HORMÔNIOS | 59 |
| 5.5 | TESTES DE ECOTOXICIDADE | 60 |
| 5.5.1 | <i>Artemia salina</i> L. | 60 |
| 5.5.2 | <i>Eisenia fetida</i> L. | 63 |
| 5.5.3 | <i>Allium cepa</i> L. | 68 |
| 5.5.4 | Cultura | 73 |
| 6 | CONCLUSÃO | 78 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |

1 INTRODUÇÃO

Seguindo as diretrizes de Dudley, Stolton e Shadie (2013), uma área protegida é definida como um espaço geográfico claramente demarcado, reconhecido, dedicado e administrado legalmente ou por outros meios eficazes, com o objetivo de alcançar a conservação de longo prazo da natureza, juntamente com os serviços ecossistêmicos e valores culturais associados a ela. A conceituação das áreas protegidas foi estabelecida na Convenção da Diversidade Biológica (CDB) (Brasil, 1994), que reconhece a importância dessa estratégia de conservação *in situ* para alcançar seus objetivos (Decreto Legislativo nº 2, Artigo 8).

Após quase duas décadas de formulação e trâmites burocráticos, em 2000, foi promulgada a Lei 9.985, que estabeleceu o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC) no Brasil. Essa lei propõe diretrizes para as unidades de conservação (UCs) e as classifica em dois grupos principais: unidades de conservação de proteção integral e unidades de conservação de uso sustentável, cada uma com suas respectivas categorias. As unidades de conservação de proteção integral têm como objetivo primordial a preservação da natureza, permitindo apenas o uso indireto dos recursos naturais, como atividades educacionais ambientais, turismo ecológico e pesquisas científicas. Já as unidades de conservação de uso sustentável buscam conciliar a conservação da natureza com o uso sustentável dos recursos naturais (Brasil, 2000).

Contudo, a falta de apoio técnico na seleção de áreas com relevância ambiental, juntamente com a ausência de investimentos, fiscalização adequada e políticas ambientais eficazes, compromete a efetividade das unidades de conservação, se tornando um desafio significativo na gestão dessas áreas (Assis, Faria e Bayer, 2021). Dessa forma, Coelho e Rezende (2016) chegaram à conclusão de que apenas criar as UCs não é o suficiente para promover uma defesa ambiental adequada. É fundamental implementar efetivamente as unidades de conservação para garantir a proteção ativa do meio ambiente e da biodiversidade. Nesse sentido, conforme enfatizado pelos autores, é crucial considerar a desapropriação de propriedades privadas em áreas designadas como unidades de conservação.

No caso do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (RVS-CP), trata-se de uma UC de proteção integral, porém, composta por propriedades privadas, onde se é permitido o uso da terra e dos recursos naturais, incluindo

atividades como agricultura e silvicultura. No entanto, para o desenvolver dessas mesmas atividades, é difícil evitar o uso de defensivos agrícolas e, em caso de uso inadequado, pode acabar resultando em uma contaminação do ambiente e suas áreas circundantes. Ou seja, os solos em áreas agrícolas e próximos a elas são expostos a uma carga de agroquímicos, sejam eles nutrientes ou defensivos agrícolas, que podem permanecer no solo, ser absorvido pelas plantas, atingir as águas superficiais por arraste ou ser lixiviados, chegando às águas subterrâneas, podendo resultar em diversas nocividades à fauna e à flora (Filizola, Gomes e Souza, 2006).

Portanto, torna-se essencial aplicar o conceito de monitoramento ambiental, que consiste no acompanhamento sistemático das áreas naturais visando a recuperação, melhoria ou manutenção desses espaços usados pelos seres humanos, que acabam poluindo e degradando por consequência. Esse monitoramento envolve a análise de indicadores das condições ambientais, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, fornecendo diversas informações sobre a saúde dessas áreas e gerando soluções adequadas às necessidades identificadas (França e Callisto, 2019). Apesar das análises físico-químicas identificarem e quantificarem as concentrações de substâncias tóxicas, elas não fornecem informações suficientes sobre os efeitos biológicos que os poluentes e a poluição causam nos organismos.

Para avaliar os efeitos prejudiciais decorrentes da ação de agentes químicos contaminantes da água, solo e ar, recorre-se a toxicologia ambiental, na qual são realizados testes de toxicidade em espécies isoladas em laboratório, no ambiente natural ou em sistemas controlados que simulam as condições ambientais (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008; Silva, Pompêo e Paiva, 2015). Os testes ecotoxicológicos desempenham um papel fundamental no estudo da contaminação ambiental (Peduto, Jesus e Kohatsu, 2019) e a utilização de diversos bioindicadores em avaliações ecotoxicológicas, englobando diferentes níveis tróficos, proporciona informações sobre a interação do poluente com o organismo e sua susceptibilidade aos efeitos desse poluente (Arias et al., 2007). Neste contexto, é possível citar o uso dos bioindicadores animais, como *Artemia salina* L., *Eisenia fetida* L. e células de mamíferos *in vitro*, e vegetais, como *Allium cepa* L.

A *A. salina*, um microcrustáceo marinho conhecido como larva de camarão ou náuplio, é amplamente utilizada como bioindicadora de toxicidade. Esse organismo filtrador demonstra alterações claras e visíveis em resposta a pequenas variações

ambientais e é considerado uma excelente alternativa devido a sua simplicidade de manuseio, rapidez dos ensaios, baixo custo e a ausência da necessidade de técnicas assépticas e uso de equipamentos especiais (Siqueira e Carneiro, 1998; Goés et al., 2020). Já as minhocas (*E. fetida*) desempenham um papel fundamental na estruturação, fertilidade e qualidade do solo, por isso são ótimos bioindicadores para testes ecotoxicológicos terrestres, conforme estabelecido pela norma ABNT NBR 15.537/2007 (Lionetto, Calisi e Schettino, 2012).

Outro método de alto rendimento e de resultados rápidos é o teste de citotoxicidade *in vitro*, que pode ser conduzido utilizando células de mamíferos (He et al., 2020). Esse teste é capaz de identificar danos precoces causados por poluentes, mesmo que em baixas concentrações, resultando em morte celular, ou até mesmo um resultado contrário, como o efeito proliferativo. Esses resultados indicam um estresse celular causado pelos contaminantes, sugerindo sequelas cancerígenas para o ecossistema em que as amostras se encontram (Trintinaglia et al., 2015). Por fim, o bioensaio com *A. cepa* é um método que utiliza a detecção de anormalidades cromossômicas para analisar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de compostos químicos nas raízes de cebolas (Parvan et al., 2020).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da água e dos sedimentos do Rio Chopim, em pontos iniciais da drenagem superficial, no perímetro do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas. Para isso, foram utilizadas análises físico-químicas e testes de ecotoxicidade com os bioindicadores *A. salina*, *E. fetida*, células hepáticas humanas *in vitro* e *A. cepa*, com o intuito de obter informações adicionais sobre as fontes e pontos de poluição da região, bem como seus efeitos biológicos. Os dados obtidos são fundamentais para identificar medidas preventivas visando proteger o ecossistema da RVS-CP, além de fornecer uma base para a criação e manutenção de Unidades de Conservação semelhantes a essa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade das águas e dos sedimentos do Rio Chopim, em pontos iniciais da drenagem superficial, no Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas e seu entorno.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros físico-químicos, o teor de agroquímicos, metais e hormônios das águas e dos sedimentos do Rio Chopim, no Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas e logo após a UC.
- Avaliar e comparar os parâmetros físico-químicos, teor de agroquímicos, metais e hormônios das águas e dos sedimentos de três nascentes do Rio Chopim, localizadas no Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas.
- Avaliar a ecotoxicidade das águas e dos sedimentos do Rio Chopim para os bioindicadores *A. salina* (teste de imobilidade/mortalidade), *A. cepa* (teste de citotoxicidade e mutagenicidade), *E. fetida* (teste de fuga) e células Hep-G2 *in vitro* (teste de citotoxicidade do MTT).
- Avaliar e comparar a ecotoxicidade das águas e dos sedimentos de três nascentes do Rio Chopim, localizadas no Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas, para os bioindicadores *A. salina* (teste de imobilidade/mortalidade), *A. cepa* (teste de citotoxicidade e mutagenicidade), *E. fetida* (teste de fuga) e células Hep-G2 *in vitro* (teste de citotoxicidade do MTT).
- Relacionar os parâmetros químicos das águas e dos sedimentos do Rio Chopim com os efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos para os bioindicadores utilizados;
- Relacionar o uso da terra ao longo da Unidade de Conservação com os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos, teor de agroquímicos, metais e hormônios, com uso predominante da terra ao longo das áreas de contribuição hidrológica de cada ponto coletado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Uma das principais abordagens para enfrentar a crise ambiental atual e promover o desenvolvimento sustentável é a criação de áreas protegidas (Gray et al., 2016). Além de conservar a biodiversidade, essas áreas podem proporcionar uma série de outros benefícios, como serviços ecossistêmicos, o uso sustentável de recursos naturais pelas comunidades tradicionais e o manejo florestal sustentável (Medeiros e Young, 2011).

A criação de sistemas nacionais de áreas protegidas desempenha um papel fundamental na redução do risco de extinção das espécies e na preservação a longo prazo da estrutura e função dos ecossistemas (Álvarez-Malvido, 2021). No caso do Brasil e de outros países signatários da Convenção da Diversidade Biológica, essa responsabilidade resultou na promulgação da Lei 9.985/2000, que estabeleceu o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Essas unidades são definidas como espaços territoriais e seus recursos ambientais, incluindo as águas jurisdicionais, que possuem características naturais relevantes e que são legalmente instituídas pelo Poder Público. As Unidades de Conservação têm como objetivos a conservação, preservação, manutenção, recuperação, utilização sustentável e restauração dos recursos naturais, abrangendo a proteção das paisagens cênicas, a preservação de sítios históricos e/ou culturais, entre outros (Brasil, 2000; Hassler, 2006), as quais visam atender às necessidades e aspirações das gerações presentes e futuras.

É importante destacar que as Unidades de Conservação também são estabelecidas com o objetivo de assegurar a representatividade dos diversos biomas, ambientes e biodiversidade do país. Embora as metas de proteção definidas internacionalmente sejam referências importantes, elas não oferecem diretrizes específicas para a seleção e delimitação das UCs. As prioridades de conservação em cada bioma devem ser orientadas para abranger os diferentes ambientes que o compõem, concentrando-se em regiões com alta riqueza biológica, presença de espécies endêmicas, raras ou ameaçadas de extinção, áreas de grande importância como fornecedoras de serviços ambientais, bem como aquelas com alta pressão humana e elevados níveis de ameaça (Fonseca, Lamas e Kasecker, 2010).

Nesse sentido, é preciso considerar que, ao criar uma Unidade de Conservação, é fundamental considerar que ela não pode ser concebida de forma isolada em relação à sociedade como um todo (Marinelli et al., 2011). Portanto, é necessário pensar na efetividade dessas áreas em relação à melhoria da relação entre a sociedade e o meio ambiente, reconhecendo a importância das áreas protegidas em termos socioambientais e em diferentes escalas (Galvão e Tedesco, 2022). Por isso, de acordo com a Lei 9.985/2000 (SNUC, 2000), a gestão das áreas protegidas requer a elaboração de planos de manejo, que são instrumentos orientadores para esse fim, os quais devem ser elaborados no prazo de cinco anos a partir da criação das áreas (Artigo 27, §3o). No entanto, muitas UCs não possuem planos de manejo para orientar as ações dos gestores e a maioria ainda não tem a totalidade de suas áreas regularizadas, ou seja, grande parte delas ainda não pertence ao poder público, o que limita a atuação dos gestores. Como resultado, a situação precária de muitas UCs coloca em risco sua integridade e eficácia de conservação. A falta de pessoal, infraestrutura e recursos compromete suas atividades de fiscalização, gestão e uso público (Fonseca, Lamas e Kasecker, 2010).

O SNUC estabelece e regula as categorias de unidades de conservação nos âmbitos federal, estadual e municipal, dividindo-as em dois grupos distintos: Unidades de Conservação de Proteção Integral (UCPI) e Unidades de Conservação de Uso Sustentável (UCUS). As UCPI têm como principal objetivo a conservação da biodiversidade, enquanto as UCUS permitem diferentes formas de uso dos recursos naturais, com a proteção da biodiversidade como objetivo secundário (Catojo e Jesus, 2022).

As áreas de proteção integral são classificadas como parques nacionais, reservas biológicas, estações ecológicas, monumentos naturais e refúgios de vida silvestre, podendo ser destinadas a fins educacionais, recreativos e científicos. Por outro lado, as unidades de uso sustentável são subdivididas em sete categorias: áreas de proteção ambiental, áreas de relevante interesse ecológico, florestas nacionais, reservas extrativistas, reservas de fauna, reservas de desenvolvimento sustentável e reservas particulares do patrimônio natural. Essas categorias permitem diferentes tipos e níveis de interferência humana, como silvicultura, corte seletivo sustentável, proteção de bacias hidrográficas, pesquisa e recreação (Rylands e Brandon, 2005).

3.1.1 Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas

O propósito da categoria de Refúgio de Vida Silvestre é a conservação das áreas naturais, proporcionando condições adequadas para a subsistência e reprodução de espécies da flora e fauna locais, migratórias e residentes. Esses Refúgios podem ser constituídos por áreas privadas, desde que o uso da terra pelos proprietários esteja em acordo com os princípios de conservação da unidade. Caso haja discordância, conforme o Art. 13 da lei SNUC, a área deve ser desapropriada (SNUC, 2000; Strapazzon, 2015).

A categoria de Refúgio de Vida Silvestre foi inspirada nos *National Wildlife Refuges* americanos, que têm como objetivo preservar os recursos de vida selvagem no país, com especial enfoque em espécies ameaçadas, além de prever atividades recreativas e educativas relacionadas ao meio ambiente (Przyvara, 2020).

O Refúgio de Vida Silvestre Campos de Palmas é uma unidade de proteção integral estabelecida pelo Decreto Federal de 03 de abril de 2006, abrangendo uma área de 16.582 hectares nos municípios de Palmas (90,8%) e General Carneiro (9,2%), ambos localizados no estado do Paraná. Sua área de amortecimento se estende a 500 metros e adentra o estado de Santa Catarina, notavelmente no município de Água Doce. Essas três localidades são de porte médio, sendo Palmas a maior entre elas (Apremavi, 2012; Strapazzon, 2015). A região possui um clima temperado, com temperaturas médias anuais de 15° a 16° C, e é caracterizada por um clima chuvoso e relativamente quente durante todas as estações do ano, com precipitações médias que variam entre 1.800 e 2.000 mm (SIMEPAR, 2012; STCP, 2013).

Localizado na bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, o maior rio completamente inserido no estado do Paraná, o Refúgio tem uma área que abrange três sub-bacias hidrográficas: a bacia do rio Chopim, que representa 81,4% da área da UC; a bacia do Rio Jangada, que abrange 5,2%; e a bacia do rio Iratim, responsável por 13,4% do RVS-CP. Esses três rios desaguam na margem esquerda do rio Iguaçu, incluindo campos naturais com banhados dentro da área do RVS-CP (STCP, 2013). Essa característica da UC corrobora com os objetivos do presente trabalho, uma vez que os limites da UC se coincidem em quase sua totalidade com interflúvios no relevo que configuram as cabeceiras de drenagem do alto curso da bacia hidrográfica do Rio Chopim.

Referente ao Rio Chopim, cujas nascentes se encontram na porção oriental dos Campos de Palmas, há um trecho desse rio localizado dentro do RVS-CP, que possui extrema importância por ser a área de origem do volume hídrico, emergindo de áreas úmidas elevadas e abastecendo diversos municípios da região. Além disso, é possível encontrar campos naturais com banhados nessa área, indicando o afloramento de água subsuperficial devido à fina cobertura pedológica. Tais áreas possuem grande sensibilidade hidrográfica e ecológica, exigindo, conforme apontado no plano de manejo, a devida preservação (Brasil, 2016).

No interior das áreas do Refúgio também foi constatada a presença de uma diversidade significativa de mamíferos, macroinvertebrados, herpetofauna e aves, dentre os quais algumas espécies estão classificadas como em perigo, vulneráveis e quase ameaçadas de extinção (Brasil, 2016). Essas descobertas enfatizam a importância da preservação e proteção desse ambiente para assegurar a sobrevivência e reprodução desses organismos.

Com isso, sabe-se que o principal objetivo da criação do RVS-CP é proteger os ambientes naturais essenciais para a existência e reprodução da flora e fauna residente ou migratória, com destaque para os remanescentes de estepe gramíneo-lenhosa (campos de altitude), de floresta ombrófila mista (mata com araucárias) e áreas de campos úmidos e várzeas. Mas o Refúgio ainda busca incentivar pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades controladas de educação ambiental e turismo, no entanto, é importante destacar que a visitação pública ao RVS-CP está sujeita a condições e limitações estabelecidas pelo plano de manejo da unidade, e qualquer pesquisa científica requer uma autorização prévia do órgão responsável, pois está sujeita a restrições de acordo com as regulamentações (STCP, 2013).

Apesar de tudo, o RVS-CP está situado em áreas de propriedades particulares onde possivelmente diversas atividades estão sendo desenvolvidas, o que contraria as diretrizes estabelecidas no Plano de Manejo de 2016. Entre essas atividades, encontram-se práticas de silvicultura e agricultura, extração ilegal de árvores na região, presença de uma rede de transmissão de energia elétrica, utilização de técnicas inadequadas para a manutenção das estradas de terra, e ainda, caça, queimadas e atividades pecuárias sem restrições e manejo adequado (Brasil, 2016). Com base nisso, fica evidente a importância da realização de estudos que visem identificar possíveis pontos vulneráveis desta UC, os quais podem

envolver análises físico-químicas da água e dos sedimentos, bem como investigações de ecotoxicidade desses ambientes.

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUALIDADE DA ÁGUA

O monitoramento ambiental envolve a análise, coleta de dados e acompanhamento sistemático da condição dos recursos naturais nos aspectos abióticos e bióticos, com o objetivo de promover a recuperação, a melhoria ou a manutenção da qualidade do ambiente. Nesse contexto, a qualidade ambiental refere-se ao controle das variáveis ambientais que sofrem alterações, tanto devido a atividades humanas como em decorrência de processos naturais (França e Callisto, 2019).

No que diz respeito à qualidade da água, a avaliação é realizada por meio de variáveis físicas, químicas e biológicas, conhecidas como parâmetros, que são expressos em forma de concentrações, teores e valores numéricos, refletindo a interação e associação entre eles no ambiente aquático (Brasil, 2006). Por isso, é importante ressaltar a análise dos parâmetros físico-químicos, visto que oferecem informações essenciais para compreender os ecossistemas aquáticos e os padrões de variação das condições ambientais que impactam a qualidade das águas. Esses parâmetros ainda estão relacionados ao desenvolvimento da vida e das atividades humanas que dependem do uso dessas águas (ANA, 2020). Nesse caso, destaca-se os seguintes parâmetros físico-químicos: potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), turbidez, cor, fósforo (P), nitrogênio (N), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅).

No que se refere ao pH, que é um parâmetro essencial a ser avaliado, ele indica o nível de acidez ou basicidade de uma solução. O pH exerce uma influência direta sobre o equilíbrio químico nos ecossistemas aquáticos, o qual é crucial para a sobrevivência das espécies. Como alguns organismos se adaptam melhor a ambientes ácidos ou alcalinos, o pH da água desempenha um papel determinante na composição de espécies e na estrutura das comunidades biológicas nos ecossistemas aquáticos. Fatores como o consumo e a produção de dióxido de carbono (CO₂), a quantidade de matéria orgânica em decomposição, a remoção de matas ciliares nas margens dos rios e o lançamento irregular de esgotos domésticos ou industriais são alguns exemplos de fatores que podem afetar esse parâmetro (França e Callisto, 2019).

O oxigênio dissolvido também é um parâmetro amplamente utilizado como indicador da qualidade da água, no qual altas concentrações desse gás geralmente indicam uma boa qualidade da água. Por outro lado, baixos níveis de oxigênio dissolvido podem ser problemáticos, causando alterações que podem colocar em risco a vida aquática e até tornando-a imprópria para o consumo (Brasil, 2013). Dentre os gases dissolvidos na água, o oxigênio é um dos mais importantes para a dinâmica e caracterização desses ecossistemas, sendo essencial para as atividades metabólicas dos organismos aeróbicos. A solubilidade do oxigênio dissolvido é influenciada por fatores como temperatura, pressão atmosférica e salinidade da água (Carr e Neary, 2008).

A turbidez é uma característica óptica que envolve a absorção e reflexão da luz, sendo afetada pela presença de partículas em suspensão. Essas partículas têm um impacto na entrada de luz solar no ecossistema aquático que podem prejudicar os organismos vivos. As algas, por exemplo, vivem no fundo dos ambientes aquáticos e necessitam de luz para sobreviverem e, a redução da incidência de luz, acaba causando a eutrofização artificial. Com isso, a fotossíntese é reduzida pelos seres autótrofos, afetando a disponibilidade de OD no ecossistema aquático e influenciando diretamente a biota aquática (Alves et al., 2008; França e Callisto, 2019). A turbidez na coluna d'água aumenta devido à presença de materiais em suspensão, como argila, silte, matéria orgânica e inorgânica, minerais, plâncton e outros organismos microscópicos. Essas partículas entram no sistema aquático principalmente por causa da remoção da vegetação ciliar (erosão e assoreamento) ou pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais sem tratamento. No entanto, é importante ressaltar que a turbidez não pode ser atribuída exclusivamente aos impactos das atividades humanas, uma vez que existem inúmeros fatores que afetam a cor da água, incluindo sua origem geológica e a entrada de matéria orgânica vegetal (França e Callisto, 2019; ANA, 2020).

A análise de cor da água é uma análise física, responsável por identificar a quantidade de detritos presentes na água e normalmente está associada aos ácidos húmicos e taninos, gerados através da decomposição da matéria orgânica. Esse parâmetro pode ser classificado como cor verdadeira, quando se refere à matéria dissolvida, e cor aparente, onde se leva em consideração a presença de materiais em suspensão. A presença de íons metálicos dissolvidos, plânctons, macrófitas e

despejos de esgotos domésticos e industriais também são fatores que interferem na cor (Kowata, Ribeiro e Telles, 2000; Paterniani e Pinto, 2001).

O fósforo é um elemento químico crucial no metabolismo dos ecossistemas aquáticos, sendo o principal fator limitante para o crescimento das plantas. Nos ambientes aquáticos, o fósforo pode ser encontrado em formas orgânicas, como fosfatos, e em formas inorgânicas, como ortofosfatos e polifosfatos. A introdução desse composto no meio aquático ocorre por meio do lançamento de esgotos não tratados, da aplicação de fertilizantes em áreas agrícolas ou do descarte de resíduos por indústrias químicas (França e Callisto, 2019).

Segundo Esteves (1998), o nitrogênio desempenha um papel fundamental no metabolismo dos ecossistemas aquáticos, sendo um dos elementos mais importantes, visto que o nitrogênio está diretamente envolvido na formação de proteínas, que são componentes essenciais da biomassa. Nos ecossistemas aquáticos, o nitrogênio pode ser encontrado tanto na forma orgânica, como nitrogênio orgânico, quanto na forma inorgânica, como nitrato, nitrito e amônia. As principais fontes de nitrogênio nos ecossistemas aquáticos continentais são através da fixação biológica (realizada por bactérias e algas), da fixação abiótica (resultante de descargas elétricas), das chuvas e da entrada de matéria orgânica e inorgânica, resultante da lixiviação do solo. Baixas concentrações desse elemento podem se tornar limitantes para a produção primária nos ecossistemas aquáticos, ao passo que o excesso, combinado com a entrada de fósforo, desencadeia a eutrofização artificial. O excesso do nitrogênio está geralmente associado à entrada de esgotos sem tratamento, que contêm aumento de proteínas e ureia, ao uso de fertilizantes em áreas agrícolas e ao despejo de resíduos por indústrias químicas (França e Callisto, 2019; ANA, 2020).

Por fim, os parâmetros de DBO₅ e DQO são utilizados para indicar a presença de matéria orgânica na água. É conhecido que a matéria orgânica é a principal fonte de poluição das águas, pois sua decomposição reduz a concentração de oxigênio dissolvido, o que acaba ocasionando o desaparecimento de peixes e outras formas de vida aquática (Brasil, 2006; Philippi Junior, Roméro e Bruna, 2014). Os parâmetros de DBO₅ e DQO indicam a quantidade de oxigênio consumido ou a demanda necessária para estabilizar a matéria orgânica presente na amostra de água. A diferença entre esses parâmetros reside no tipo de matéria orgânica estabilizada: a DBO₅ refere-se especificamente à matéria orgânica mineralizada pela

atividade dos microrganismos, enquanto a DQO engloba também a estabilização da matéria orgânica por processos químicos. Por isso, os valores de DQO serão sempre superiores aos valores de DBO₅ (Brasil, 2006).

É importante ressaltar que a utilização da água e a sua qualidade dependem da atividade a que se destina. A água que pode ser considerada adequada para um determinado uso pode ser insatisfatória ou não recomendada para outra atividade. Nesse sentido, os níveis exigidos para os parâmetros de qualidade da água variam internacionalmente e, cada entidade governamental estabelece padrões que regem a qualidade dos seus recursos hídricos. No Brasil, a Resolução Nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 2005, e suas modificações nas Resoluções Nº 410/2009 e Nº 430/2011, são responsáveis por estabelecer os padrões de qualidade da água. Essas resoluções definem os limites aceitáveis dos elementos nos corpos hídricos, de acordo com a finalidade de uso.

3.3 ANÁLISE DE METAIS PESADOS

Sabe-se que uma das principais causas de poluição dos recursos hídricos é a atividade humana. No caso dos metais pesados, essa relação se torna ainda mais evidente, uma vez que a contaminação dos ecossistemas aquáticos naturais é proveniente de atividades como mineração, indústrias, despejo de efluentes domésticos e agricultura (ANA, 2020; Negrão, Oliveira e Butik, 2021). O termo "metais pesados" possui várias definições, sendo a maioria delas baseada em suas propriedades químicas. No entanto, geralmente se refere a um grupo de metais e semimetais associados à contaminação ambiental, potencial tóxico e ecotoxicidade em altas concentrações (Lima e Merçon, 2014; Li et al., 2019). Entre os metais pesados mais estudados devido à sua toxicidade para os seres humanos estão o cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), manganês (Mn) e mercúrio (Hg) (Guarda et al., 2021).

Os metais pesados são contaminantes inorgânicos que podem afetar as características físicas, químicas e biológicas das águas naturais, ar, solo, plantas e alimentos. Eles têm a capacidade de serem absorvidos ou acumulados em organismos bentônicos, em alguns casos atingindo níveis tóxicos (Arias et al., 2007), e podem contaminar a cadeia alimentar por meio da lixiviação para águas subterrâneas ou da absorção pelas plantas e subsequente bioacumulação (Batista e Freire, 2010). Essa contaminação contribui para a deterioração da qualidade da

água, representando um risco para a vida aquática e para o ecossistema como um todo (Benson et al., 2018).

O estudo realizado por Guarda et al. (2021) realizou a determinação da concentração de diversos metais (Ba (bário), Cr, Cu, Zn (zinco), Ni (níquel), Pb, Fe (ferro) e Al (alumínio)) por Espectrômetro de Emissão Atômica de Plasma por Microondas, em amostras de água, solo e sedimento do Rio Formoso, Tocantins, Brasil. Os resultados indicaram que a maioria dos metais na água apresentaram concentrações dentro dos valores estabelecidos pela legislação do CONAMA 354/2005 (Brasil, 2005), com exceção do alumínio e do ferro, metais que apresentam concentrações naturalmente altas nas águas do Tocantins, e do bário, o qual apresentou concentração alta quando comparado aos demais metais. Nas amostras de solo, as concentrações que ficaram acima do permitido pelo CONAMA 460/2013 (Brasil, 2013) foram dos metais Cr e Ba. Por outro lado, nas amostras de sedimentos, a concentração do Mn se mostrou elevada. Apesar da distribuição dos metais terem apresentado comportamentos distintos, as concentrações mais altas foram identificadas em pontos amostrados com maior proximidade a atividades agrícolas, causando preocupação com o avanço da agricultura na região.

3.4 ANÁLISE DE AGROQUÍMICOS

Com base na Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (Brasil, 1989), os agroquímicos englobam produtos e agentes que utilizam processos físicos, químicos ou biológicos, destinados a serem aplicados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou plantadas, outros ecossistemas, bem como ambientes urbanos, hídricos e industriais. Seu propósito é alterar a composição da flora ou fauna, com a finalidade de protegê-las de organismos considerados nocivos.

O Brasil é o país com o maior consumo de agroquímicos globalmente e, diversos estudos têm evidenciado os impactos negativos desses produtos na saúde humana e no meio ambiente. As regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil são as que mais utilizam estes produtos, correspondendo a 33,07% e 30,61% do consumo total no país, respectivamente. Somente no estado do Rio Grande do Sul são utilizados 11,32% do volume de agroquímicos empregados no Brasil, totalizando 134 milhões de litros em 8,5 milhões de hectares cultivados. Herbicidas, inseticidas e fungicidas representam 80,61% dos produtos comercializados, sendo o herbicida glifosato o

ingrediente ativo mais utilizado na agricultura brasileira, responsável por 32% do consumo total de agroquímicos (Pignati et al., 2017; Lucas et al., 2020).

Atualmente, a contaminação dos recursos hídricos por agroquímicos ocupa o segundo lugar como causa de contaminação, ficando atrás apenas da contaminação por esgotos domésticos. O problema reside no fato de que muitas dessas substâncias têm alta probabilidade de afetar negativamente os recursos hídricos devido a características como sua capacidade de se deslocar facilmente no perfil do solo (lixiviação), persistência prolongada no solo, solubilidade relativamente baixa a moderada em água e capacidade moderada de se adsorver à matéria orgânica presente no solo (ANA, 2020). É importante ressaltar também que é comum a combinação de diferentes produtos biocidas, cuja mistura pode alterar o comportamento tóxico desses produtos, resultando em efeitos sinérgicos ou até mesmo cumulativos, efeitos dos quais não se tem conhecimento sobre os organismos (Spadotto, 2006).

Em geral, quanto maior a concentração de pesticidas e mais longo o tempo de exposição, maiores são as chances de os impactos negativos atingirem níveis mais elevados de organização biológica, como comunidades e ecossistemas. Quando um estresse causado pelos pesticidas persiste por tempo suficiente para causar a morte de uma população de organismos, afetando suas taxas de crescimento, reprodução e impedindo a entrada de novas espécies, ele pode alterar a estrutura da comunidade como um todo (Cairns e Pratt, 1993). Fan et al. (2018) destaca que ainda existem lacunas no conhecimento científico sobre os efeitos dos agroquímicos no ambiente e na saúde humana quando esses produtos são assimilados por plantas, animais e seres humanos. Pequenas concentrações de diversos agroquímicos que são ingeridos ao longo do dia, por meio dos alimentos e da água, durante um período prolongado, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer, danos ao fígado e rins, além de distúrbios neurológicos, como Parkinson e Alzheimer (Hayes e Laws, 1991; Belingheri et al. 2022).

É importante ressaltar que a UC Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas está situada em uma área próxima as fronteiras entre Paraguai e Argentina e, nessa região se tem a comercialização ilegal de produtos agrícolas, sendo que muitos deles são de uso proibido no Brasil. Em janeiro de 2023 a Polícia Rodoviária

Federal apreendeu mais de 6 mil litros de herbicidas no município de Água Doce, em Santa Catarina, localizado há menos de 70 km do RVS-CP (Fochzato, 2023).

Nesse sentido, a Agência Nacional de Águas (ANA, 2020) reforça que para a preservação dessas águas é necessário implementar práticas agrícolas mais adequadas ao uso de agroquímicos, além de tornar estas práticas obrigatórias e garantir a difusão destas informações para a sua efetiva realização.

3.5 HORMÔNIOS

Os hormônios estrógenos consistem em um grupo de hormônios esteroides, podendo ser de origem natural ou sintética, que apresentam um alto potencial de provocar desregulação no sistema endócrino de certos organismos que habitam ambientes aquáticos. Isso pode resultar em feminização, diminuição das taxas de natalidade, má formação neonatal e o desenvolvimento de anomalias físicas em peixes (Belhaj et al., 2015).

O termo "estrogênio" abrange diversos hormônios quimicamente semelhantes, como a estrona (E1), o 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3), que são de origem natural, e o 17 α -etinilestradiol (EE2), um hormônio sintético, presente na maioria dos contraceptivos e excretado por meio das fezes e urina (Schmitt, Kieling e Caetano, 2019). Esses hormônios são classificados como micro poluentes, pois mesmo em concentrações baixas, abaixo de 1 μ g/L, são capazes de causar disfunções nos organismos em contato com eles (Koerich et al., 2021).

No Brasil, onde o tratamento de esgoto não é realizado em nível terciário, o descarte de efluentes domésticos é a principal fonte de pressão sobre os corpos d'água. Nesse caso, a contaminação é causada principalmente pela excreção de medicamentos e do descarte inadequado desses produtos. Além disso, produtos de cuidado pessoal, higiene, limpeza e defensivos agrícolas também são mencionados como causadores de efeitos prejudiciais (Koerich et al., 2021). As estações de tratamento de esgoto (ETE) no país geralmente utilizam processos biológicos como a principal tecnologia de tratamento, com tecnologias mais avançadas sendo aplicadas apenas em ocasiões específicas. Assim, ETES são projetadas para reduzir a quantidade de poluentes orgânicos, normalmente em excesso, e, possivelmente, patógenos e outros nutrientes, mas não são focadas exclusivamente na remoção de contaminantes emergentes. Qualquer eliminação dessas substâncias que ocorra é

incidental e inerente ao processo de tratamento (Stominsky, Bortolotto e Andrezza, 2022).

Como apresentado por Padilha e Leitzke (2013), a concentração de hormônios sexuais femininos nas águas e sedimentos da bacia do Alto Iguaçu, na região de Curitiba, Paraná, foram elevadas em termos de E2 e EE2, além da presença de E1 em baixas concentrações. Nesse caso, as concentrações de E2 variaram entre 0,26 µg/L e 7,35 µg/L, e para EE2 as concentrações oscilaram entre 0,05 µg/L até 9,52 µg/L. Ambos os hormônios podem ser encontrados na formulação de anticoncepcionais, sendo assim, a presença desses hormônios nas águas superficiais pode ser originada através de possíveis contaminações provenientes do despejo de esgotos domésticos nessa região.

3.6 TESTES DE ECOTOXICIDADE

A ciência que se dedica ao estudo dos efeitos prejudiciais causados por substâncias químicas em organismos vivos é conhecida como toxicologia (Zakrzewski, 1997). Seus principais objetivos incluem a identificação dos riscos associados a uma determinada substância e a determinação das condições de exposição que levam a esses riscos. A toxicologia investiga experimentalmente a ocorrência, natureza, incidência, mecanismo e fatores de risco relacionados a substâncias tóxicas (James, Roberts e Williams, 2022). Assim, a toxicologia ambiental concentra-se na avaliação do impacto dos agentes tóxicos presentes no ambiente sobre a saúde e o bem-estar de humanos, animais e plantas, considerando as interações entre esses organismos (Yu, Tsunoda e Tsunoda, 2011).

Os testes de toxicologia, também conhecidos como testes de toxicidade, são ensaios realizados em laboratório sob condições experimentais específicas e controladas. Esses testes têm como objetivo avaliar a toxicidade de substâncias, a carga poluidora de efluentes industriais e a qualidade de amostras ambientais, como águas ou sedimentos. Durante esses ensaios, organismos-teste são expostos a diferentes concentrações das amostras e os efeitos tóxicos resultantes são observados e quantificados. Esses testes são frequentemente complementados por análises físico-químicas, cujos limites são estabelecidos pelas legislações ambientais. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações de substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito

dessas substâncias em sistemas biológicos, proporcionando resultados que se complementam (Costa et al., 2008).

Quando se trata da seleção de organismos para testes ecotoxicológicos, Freddi e Américo-Pinheiro (2017) e Costa et al. (2015) destacam a importância de utilizar organismos de diferentes níveis tróficos, a fim de avaliar a segurança ambiental. Além disso, é necessário conduzir pesquisas para identificar o organismo mais sensível a cada poluente, substância ou solução em questão. Ao escolher um indicador biológico adequado, algumas características devem ser consideradas, como por exemplo: i) ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível por não-especialistas; ii) possuir ampla distribuição geográfica; iii) ser abundante na natureza; iv) ter características ecológicas bem estudadas e conhecidas; v) ser viável para uso em estudos laboratoriais (Peres e Moreira, 2003). Entre as espécies mais relevantes para a condução de bioensaios, destacam-se os peixes, os microcrustáceos e as algas, visto que esses grupos são reconhecidos por sua sensibilidade às variações dos parâmetros ambientais e representam diferentes níveis tróficos (Dezzoti, 2008).

Com base nesse conhecimento, é possível observar que existem diversos métodos padronizados por entidades reguladoras para detecção e quantificação da toxicidade em amostras de diferentes ecossistemas e substâncias. Esses ensaios, que são amplamente utilizados na comunidade científica, podem variar em termos de tipo de teste (agudo ou crônico), critérios avaliados (letalidade, inibição/letalidade, inibição da luminescência, reprodutibilidade, inibição do crescimento, entre outros), duração (15 minutos, 30 minutos, 24 horas, 48 horas, 72 horas e dias) e organismos utilizados nos testes, dependendo do nível trófico a ser investigado.

3.6.1 *Artemia salina* L.

A *A. salina* é um microcrustáceo pertencente à ordem Anostraca, caracterizado por não possuir carapaça. Essas criaturas são naturalmente encontradas em lagos de água salgada e possuem capacidade de sobreviver em ambientes com concentrações tão elevadas de salinidade que seus predadores dificilmente sobrevivem a tais condições (Abatzopoulos et al., 2002). A *A. salina* é uma espécie filtradora que se alimenta de detritos orgânicos, algas e bactérias microscópicas. Além de sua resistência às flutuações ambientais, esses microcrustáceos são amplamente utilizados como alimento para peixes, seja em sua

forma natural ou como ração na aquicultura, tornando-os um produto comercial de fácil acesso. A ausência desse organismo no meio aquático pode acarretar sérios danos ao ambiente, pois interfere diretamente na cadeia alimentar dos recursos hídricos (Ates et al., 2013; Kumar et al., 2016; Silva et al., 2020).

Além disso, a *A. salina* é um dos organismos de teste mais valiosos e amplamente utilizados em ensaios de ecotoxicidade, sendo a espécie mais empregada em testes de letalidade para avaliar a toxicidade de diferentes meios, como suplemento fitoterápico de chá verde Matcha (*Camellia sinensis* L.), microplásticos de polipropileno, veneno de cobra, droga recreativa 25C-NBOMe, entre outros (Álvarez-Alarcón et al., 2021; Okumu et al., 2021; Jeyavani et al., 2022; Silva et al., 2022), devido à sua capacidade de rápido cultivo, aplicação e baixo custo (Rajabi et al., 2015). Suas características, como ciclo de vida curto, tamanho reduzido do corpo e processo simples de eclosão de cistos, tornam essa espécie adequada para testes toxicológicos de curta duração e pesquisas com orçamentos e recursos limitados (Cruzeiro et al., 2017). Esse bioensaio consiste na exposição dos microcrustáceos a diferentes concentrações das amostras a serem avaliadas e água salina, com o objetivo de analisar a taxa de mortalidade ao longo de um período de tempo, que pode variar de 24 a 72 horas. O teste de mortalidade pode ser conduzido isoladamente ou em combinação com outros bioensaios em estudos mais abrangentes para avaliação de toxicidade (Rajabi et al., 2015).

3.6.2 *Eisenia fetida* L.

As minhocas são frequentemente utilizadas como organismos de teste em ensaios de toxicidade devido ao seu papel crucial na formação do solo, decomposição de materiais e produção de húmus. Suas células imunológicas se encontram principalmente em seu trato intestinal e, por se alimentarem de grandes quantidades de solo durante seu deslocamento, elas absorvem os contaminantes presentes por meio do contato direto, da passagem através de sua cutícula e da constante ingestão do solo, acumulando esses poluentes e, conseqüentemente, sofrendo alterações em seu comportamento (Andréa, 2010; Lionetto, Calisi e Schetino, 2012). Como Sivakumar (2015) explica, as minhocas desempenham um papel ecologicamente importante no ecossistema do solo, pois além de apresentarem respostas comportamentais, também apresentam respostas morfológicas frequentemente utilizadas em estudos de toxicidade.

Existem diversos métodos para avaliar a toxicidade de substâncias químicas utilizando esses organismos, pois ao expor as minhocas a diferentes dosagens de reagentes químicos, pode-se observar diversas reações, tais como variações na produção e peso de casulos, efeitos fisiológicos e deformações, comportamento de espiralamento, mudanças na capacidade de escavação, agitação, fuga e rejeição ao solo contaminado. Além disso, podem ocorrer alterações no senso de equilíbrio ou direção, escavação anormal do substrato, fobias e até mudanças na alimentação e respiração (Andréa, 2010). Testes de genotoxicidade realizados com esses organismos demonstraram diminuição no número de células, coleomócitos e formação de micronúcleos, indicando a presença de substâncias tóxicas (Calisi, Lionetto e Schettino, 2009). No entanto, o comportamento de fuga geralmente é o primeiro sinal demonstrado pelo organismo como mecanismo de defesa, antes de ocorrerem outros efeitos não tão imediatos da exposição a condições adversas (Hellou, 2011).

As espécies mais comumente utilizadas são a *E. fetida* e a *E. andrei*, no entanto, a espécie *E. fetida* é facilmente cultivada em laboratório, tornando-a mais recomendada para testes toxicológicos (OECD, 1984), além de ser capaz de se alimentar de uma ampla variedade de substratos e suportar variações de temperatura e umidade. A abundância das minhocas, representando de 40% a 90% da biomassa da macrofauna na maioria dos ecossistemas (Fragoso et al., 1999), reforça sua relevância como organismos de teste em estudos de ecotoxicidade, devido ao papel fundamental que desempenham nos ciclos do solo, através da decomposição e mineralização de nutrientes. Elas são consideradas espécies-chave na comunidade de decompositores (Ingham e Coleman, 1984), além de que sua suscetibilidade a produtos químicos é semelhante à de outras espécies de minhocas (Yasmin e D'Souza, 2010).

3.6.3 *Allium cepa* L.

A. cepa, uma planta superior também conhecida comercialmente como cebola, é amplamente reconhecida como um excelente bioindicador dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de poluentes ambientais (Grant, 1982; Grant, 1999), utiliza a detecção de anormalidades cromossômicas como um dos indicadores para analisar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de compostos químicos nas raízes de cebola. Esse método, que realiza a avaliação das alterações

cromossômicas em raízes de cebolas, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (Bagatini, Silva e Tedesco, 2007).

Fiskesjö (1985) destaca o uso de sistemas vegetais em testes de ensaio para determinar os efeitos adversos de certos compostos químicos. Os bioensaios com plantas têm se mostrado testes eficientes para monitorar a genotoxicidade de poluentes na água e no solo, incluindo agroquímicos, devido à sua sensibilidade e simplicidade em comparação aos estudos com animais (Grant, 1999; Ma, 1999). Além disso, El-Shahaby et al. (2003) consideraram o teste com *A. cepa* como o mais adequado para detectar toxicidade/genotoxicidade na avaliação dos níveis de poluição ambiental, que representam riscos diretos ou indiretos para a população humana. Embora existam diferenças metabólicas entre vegetais e animais, a ativação pró-mutagênica em plantas é altamente relevante, considerando que os seres humanos estão constantemente expostos a esses riscos ao consumir vegetais tratados com agentes químicos (Grippa et al., 2010).

A análise de alterações cromossômicas é um teste capaz de medir a mutagenicidade e é um dos poucos métodos disponíveis capazes de mensurar danos em sistemas expostos a potenciais agentes mutagênicos ou carcinogênicos. Para que seja possível avaliar os efeitos e danos causados por esses agentes, é importante que a amostra esteja em constante divisão mitótica, a fim de identificar os efeitos tóxicos e as alterações que ocorrem ao longo do ciclo celular (Bagatini, Silva e Tedesco, 2007). Com esse conhecimento, entende-se o motivo do teste com *A. cepa* ser amplamente utilizado, visto que o índice mitótico e o índice de replicação são usados como indicadores da proliferação adequada das células (Gadano et al., 2002; Silva, Erdtmann e Henriques, 2003), os quais podem ser medidos por meio desse teste. Portanto, nos bioensaios com *A. cepa*, após a exposição dos bulbos de cebola à solução-teste por um determinado período, é possível avaliar tanto os efeitos citotóxicos, como a redução do crescimento das raízes ou a diminuição do índice mitótico, quanto os efeitos genotóxicos, geralmente analisando micronúcleos ou anormalidades na anáfase-telófase (Fiskesjö e Levan, 1993).

Além do mencionado anteriormente, o teste com cebolas também se destaca por sua baixa complexidade e custo reduzido, permitindo que seja realizado em um curto período de tempo, o que auxilia nos estudos de prevenção e controle de danos

ao meio ambiente (Fiskesjö, 1985). Válido ressaltar também que esses testes são altamente sensíveis e apresentam boa correlação com outros sistemas de teste, possibilitando múltiplas exposições ao mesmo composto para fins de monitoramento, são ensaios simples, com rápido crescimento das raízes e sua análise é facilitada devido à produção de um grande número de células em divisão (Bagatini, Silva e Tedesco, 2007).

3.6.4 Citotoxicidade *in vitro*

Em resposta ao aumento do rigor no controle do uso de animais em laboratório, com o objetivo de diminuir ou até erradicar essa prática, torna-se crucial a elaboração e harmonização de experimentos *in vitro* (Cruz, 2003; Rogero et al., 2003).

As técnicas *in vitro* proporcionam diversos benefícios comparadas aos métodos *in vivo*, como a capacidade de limitar o número de variáveis experimentais, fornecer informações significativamente relevantes em um intervalo de tempo reduzido, além de apresentar alta sensibilidade e consistência nos resultados, além de também serem economicamente viáveis para a realização de estudos de biocompatibilidade *in vitro* (Rogero et al., 2003; Trintinaglia et al., 2015). Essas vantagens reforçam que os testes de citotoxicidade em culturas de células podem ser eficazes para avaliar a toxicidade ambiental de diferentes amostras (Suarez Rocha et al., 2010).

Testes de citotoxicidade podem ser valiosos para identificar danos em estágios iniciais, uma vez que os poluentes na água exibem dois efeitos primordiais nas células: efeitos tóxicos, resultando em morte celular, e efeitos proliferativos, potencialmente ligados a impactos carcinogênicos na biota afetada (Suarez Rocha et al., 2010). A presença desses poluentes pode levar a mudanças morfológicas e na aderência celular, irregularidades no ciclo celular e no DNA (ácido desoxirribonucleico), e alterações em atividades enzimáticas, especialmente as associadas ao processo de biotransformação (Suarez Rocha et al., 2010; Khatibisepehr et al., 2011)

Considerando o exposto, foram padronizados diversos métodos *in vitro* para analisar a toxicidade de compostos utilizando culturas celulares. Esses testes de citotoxicidade envolvem o contato direto ou indireto do material a ser avaliado com uma cultura de células de mamíferos e a observação das mudanças celulares por

meio de vários mecanismos, incluindo a incorporação de corantes vivos ou a inibição do crescimento de colônias celulares (Rogero et al., 2003). O parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser determinada com a ajuda de corantes vivos, como o vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) e o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Fotakis e Timbrell, 2006). Em um pH fisiológico, o vermelho neutro atravessa facilmente a membrana plasmática e se acumula no interior dos lisossomos, onde se fixa através de ligações eletrostáticas hidrofóbicas em locais aniônicos na matriz lisossomal. Uma vez que muitas substâncias são capazes de danificar as membranas, resultando em diminuição da captação e ligação do vermelho neutro, é possível diferenciar células vivas de células danificadas ou mortas medindo a intensidade da cor da cultura celular (Ciapetti et al., 1996). Por outro lado, o MTT é um sal amarelo solúvel que é metabolizado pela succinato desidrogenase encontrada na mitocôndria, transformando-se em um produto azul insolúvel. A perda do gradiente de pH por morte/morbidade celular ou perda da permeabilidade da membrana também impede a incorporação desses corantes (Harbell et al., 1997; Cruz, 2003; Rogero et al., 2003).

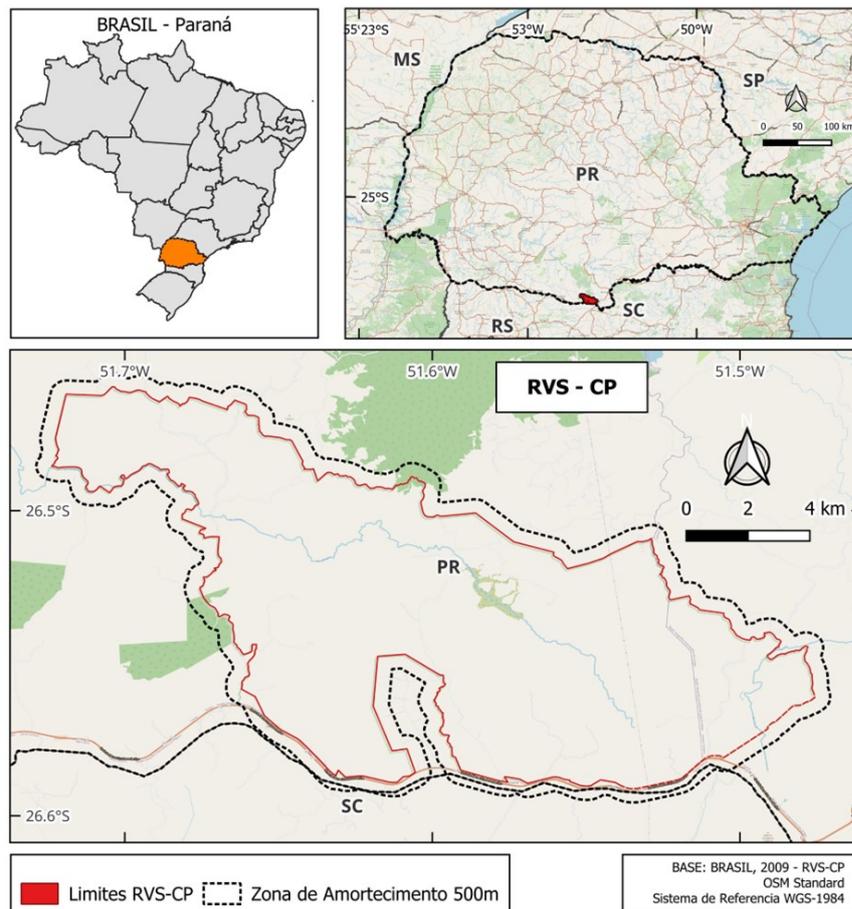
Portanto, pode-se dizer que o uso de métodos *in vitro* e os testes de citotoxicidade em análises ambientais são ótimas alternativas para avaliar a toxicidade de potenciais contaminantes de maneira eficiente e ética. Através da observação direta de alterações celulares e da viabilidade celular, podemos detectar os efeitos tóxicos e proliferativos dos poluentes nas células. Essas abordagens abrem caminho para uma avaliação mais precisa do impacto ecológico de contaminantes ambientais, permitindo a identificação precoce de danos e uma resposta mais efetiva para a preservação do meio ambiente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas está localizado no estado do Paraná, região Sul do Brasil, nos municípios de General Carneiro e Palmas, e abrange uma área aproximada de 16.582 hectares (Figura 1). A UC está inserida geograficamente em uma região de predomínio da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias), apresentando remanescentes de campos limpos entremeados por capões e campos úmidos (várzeas e banhados) (Brasil, 2016). Em relação a bacia hidrográfica, o RVS-CP encontra-se na bacia do Rio Iguaçu e a região abrange as cabeceiras de drenagem e alto curso do Rio Chopim.

Figura 1 – Localização do Rio Chopim e limites do RVS-CP

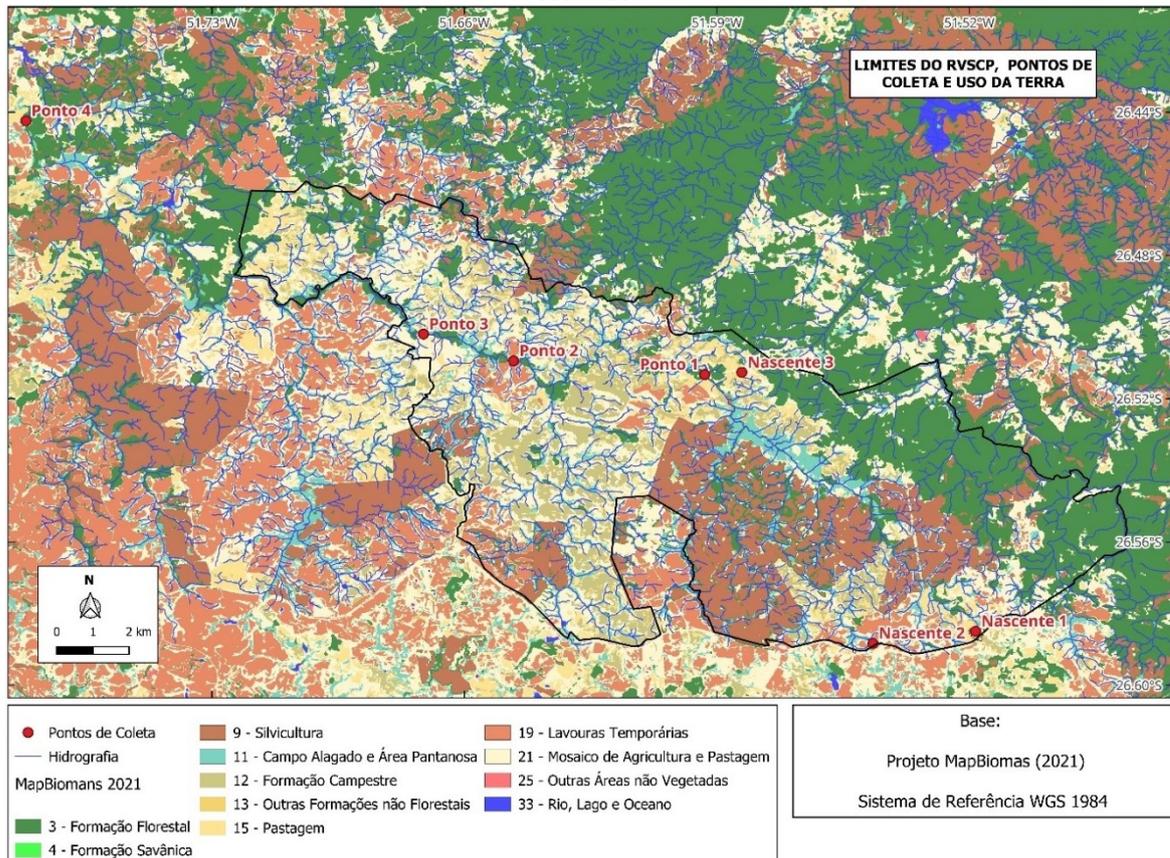


Fonte: Autoria própria (2024)

4.2 PONTOS DE COLETA

O Rio Chopim é um dos cursos de água do RVS-CP, sendo que dentro desta unidade de conservação encontram-se várias nascentes. A escolha dos pontos de coleta de amostras de água e sedimento buscou identificar possíveis variações ao longo deste rio, desde sua nascente, passando por dentro da UC, até sair dos limites do Refúgio. Assim, a escolha dos pontos de coleta levou em conta fatores como a localização, o uso do solo das áreas de contribuição hidrológica de cada ponto e o acesso às áreas de coletas das amostras. Além disso, baseou-se nos resultados e nos pontos de coleta do trabalho de Schutz et al. (2021) e nas posições das nascentes do Rio Chopim dentro do RVS-CP.

Figura 2 - Localização dos pontos de coleta de água e sedimento do Rio Chopim e limites do RVS-CP



Fonte: Autoria própria (2024)

As amostras foram coletadas em novembro de 2021 em sete pontos ao longo do Rio Chopim: Nascentes 1 (N1), 2 (N2) e 3 (N3), Pontos 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) – dentro do RVS-CP, sendo o P3 pouco antes do limite da Unidade – e Ponto 4 (P4) – localizado fora dos limites do RVS-CP, a jusante do Rio Chopim (Figura 2). Os

pontos de coleta foram georreferenciados com o uso de GPS e as coordenadas estão apresentadas na Tabela 1, sendo que as amostras de água e sedimento foram coletadas da mesma posição geográfica.

As coletas seguiram as metodologias descritas no “Standard Methods” (APHA, AWWA e WEF, 1998, 2012) para coleta e armazenamento das amostras. As amostras de água foram coletadas com auxílio de um coletor plástico, em locais de difícil acesso ao meio do leito do rio, e armazenadas em garrafas plásticas limpas. Nos locais de acesso, as garrafas plásticas foram imersas no ponto de coleta de água do rio a cerca de 30 cm da superfície. Em sequência, as amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas e transportadas ao laboratório, onde permaneceram armazenadas a 10 °C ou -6 °C, de acordo com as normas para a execução de cada metodologia.

Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de água e sedimento do Rio Chopim

| Pontos | Latitude | Longitude | Descrição |
|-----------|----------------|----------------|-----------------------------|
| N1 | 26°35'5.84" S | 51°31'5.80" O | Nascente dentro do RVS-CP |
| N2 | 26°35'17.89" S | 51°32'48.15" O | Nascente dentro do RVS-CP |
| N3 | 26°30'45.52" S | 51°34'59.07" O | Nascente dentro do RVS-CP |
| P1 | 26°30'47.74" S | 51°35'36.15" O | Rio Chopim dentro do RVS-CP |
| P2 | 26°30'34.00" S | 51°38'46.99" O | Rio Chopim dentro do RVS-CP |
| P3 | 26°30'6.98" S | 51°40'16.85" O | Rio Chopim dentro do RVS-CP |
| P4 | 26°26'32.63" S | 51°46'53.73" O | Rio Chopim fora do RVS-CP |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Fonte: A autoria própria (2024)

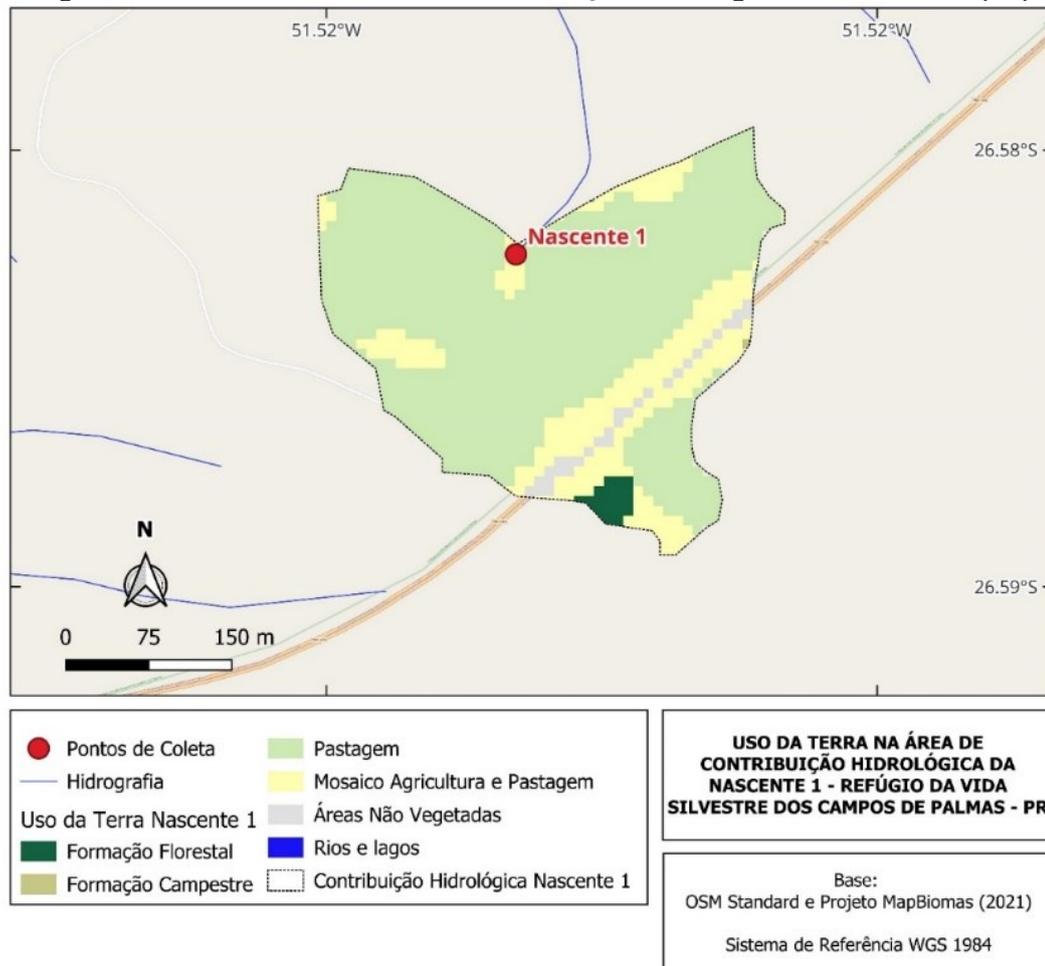
Nos mesmos pontos de coleta de amostras de água foram coletadas as amostras de sedimento, as quais foram armazenadas em sacolas plásticas identificadas e, no laboratório, os sedimentos foram homogeneizados e secos em estufa (50°C), para então serem macerados e peneirados em malha de tecido com granulometria fina (< 63 µm) para posterior análise.

A Nascente 1 (N1) (Figura 3), dentro dos limites do RVS-CP, está situada em uma área de campo, sendo composta predominantemente por pastagem (76%) e com baixa presença de gramíneas nativas (0,06%), sendo uma região pouco alterada (Tabela 2). Além disso, mais 19,87% da área está destinada à uma mescla de agricultura e pastagem. Nessa região há presença de cursos de água com cerca de 50 cm de largura que estão escondidas em meio à vegetação, e ainda, num raio

de aproximadamente 200 m, há uma pequena área de reflorestamento com pinus (1,53%).

A Nascente 2 (N2) (Figura 4), dentro do RVS-CP, está próxima a lavouras de plantio de batata. O uso da terra na área de contribuição hidrológica dessa nascente apresenta predominância em áreas de agricultura e pastagem (81,89%) e de lavouras temporárias (13,7%), e ainda uma baixa presença de formação campestre (4,3%) e de campo alagado (0,11%) (Tabela 2). Essa nascente está totalmente antropizada, com solo revolvido e nas proximidades foi feito um pequeno barramento para construção de uma estrada, deixando uma canalização para a água escoar. Nesse ponto também foi encontrado galões de agroquímicos vazios.

Figura 3 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica da Nascente 1 (N1)



Fonte: Autoria própria (2024)

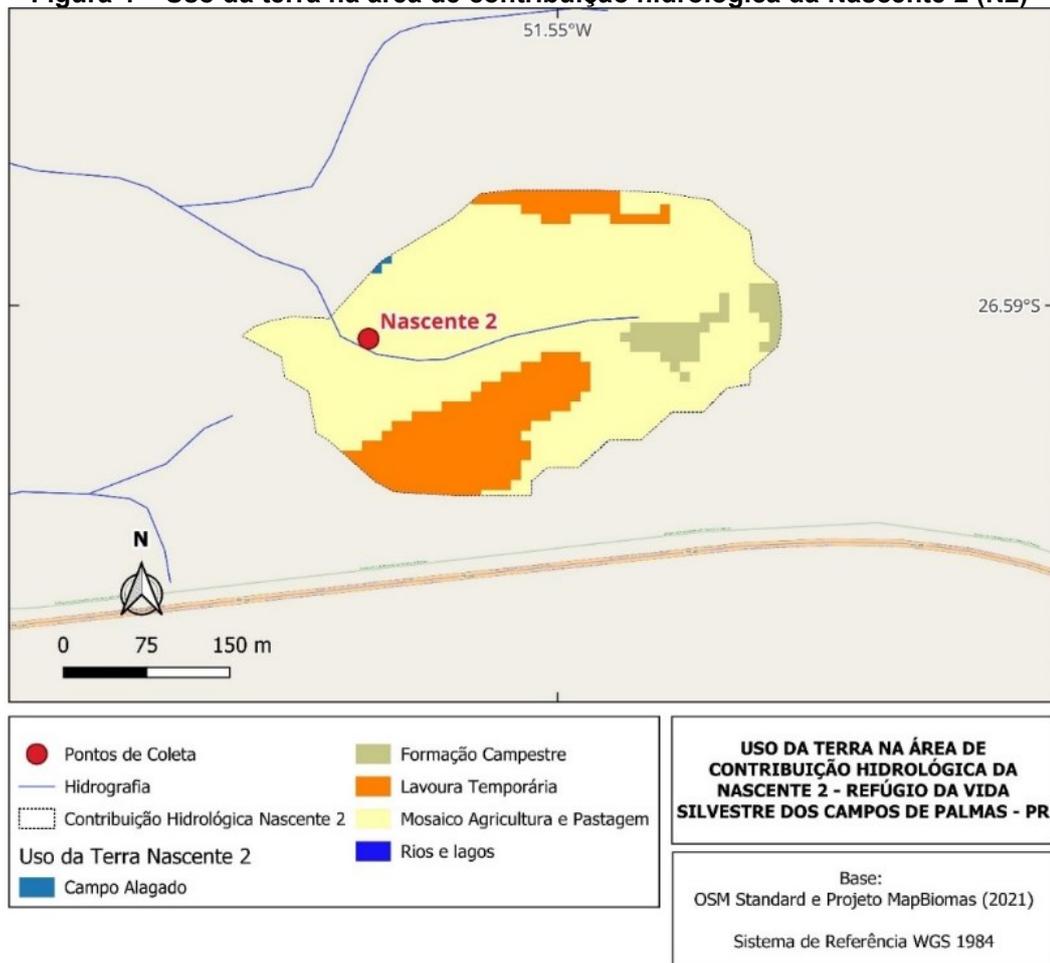
Tabela 2 – Uso da terra (%) na área de contribuição hidrológica dos pontos de coleta das amostras de água e sedimento do Rio Chopim

| | N1 | N2 | N3 | P1 | P2 | P3 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Outras áreas não vegetadas | 2,54 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,12 | 0,10 |
| Formação Florestal | 1,53 | 0,00 | 8,87 | 12,56 | 11,16 | 11,32 |
| Mosaico de Agricultura e Pastagem | 19,87 | 81,89 | 51,15 | 19,35 | 26,95 | 28,49 |
| Pastagem | 76,00 | 0,00 | 25,67 | 6,47 | 7,52 | 8,13 |
| Formação Campestre | 0,06 | 4,3 | 14,31 | 5,86 | 12,70 | 12,94 |
| Campo Alagado e Área Pantanosa | 0,00 | 0,11 | 0,00 | 12,71 | 11,34 | 11,45 |
| Lavouras Temporárias | 0,00 | 13,7 | 0,00 | 6,90 | 7,67 | 7,23 |
| Silvicultura | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 35,98 | 22,46 | 20,25 |
| Rios e Lagos | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,06 | 0,10 | 0,08 |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP.

Fonte: Autoria própria (2024)

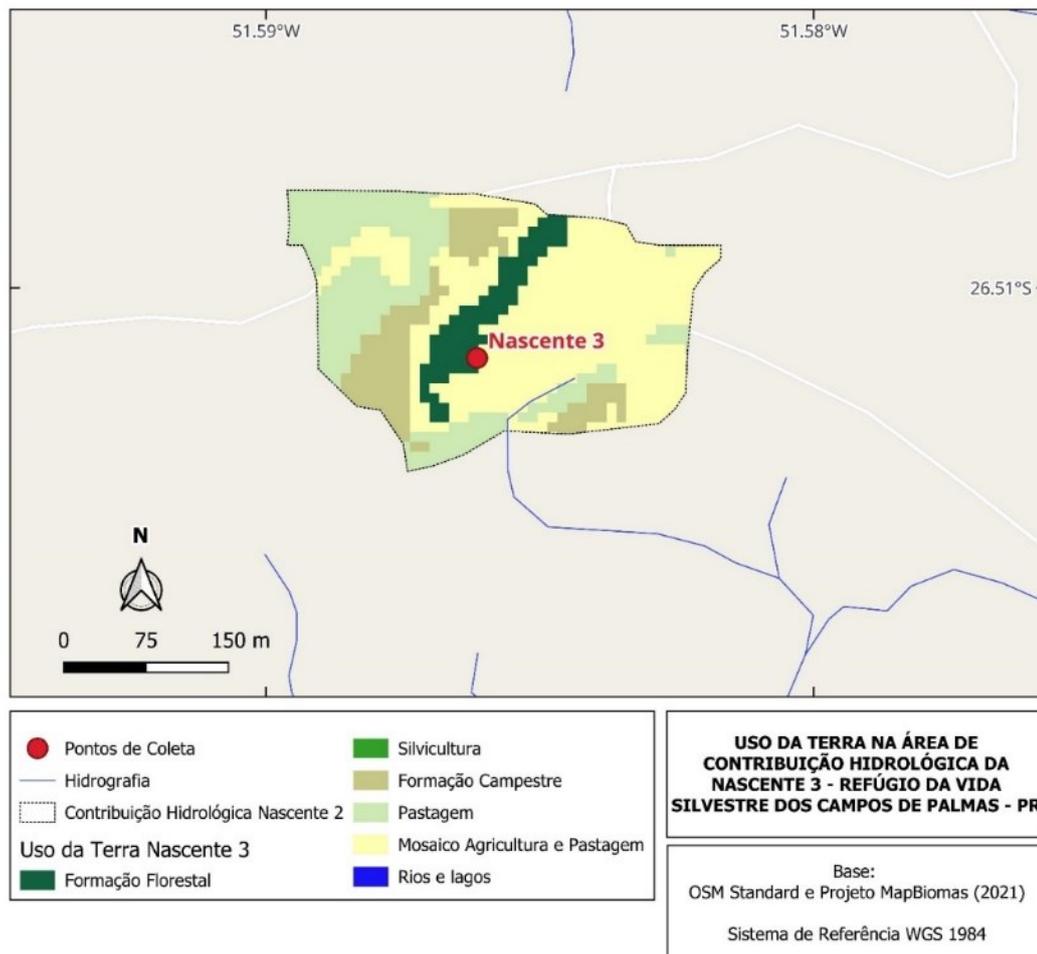
Figura 4 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica da Nascente 2 (N2)



Fonte: Autoria própria (2024)

A Nascente 3 (N3) (Figura 5), dentro do RVS-CP, é uma área alagada de baixo gradiente topográfico. No seu entorno pode se observar presença de áreas de pastagens (25,67%), campos nativos (14,31%) e formação florestal (8,87%), apesar de ser uma área majoritariamente composta pelo mosaico de agricultura e pastagem (51,15%) (Tabela 2). É válido ressaltar que no ponto onde foi realizada a coleta existe uma pequena barragem.

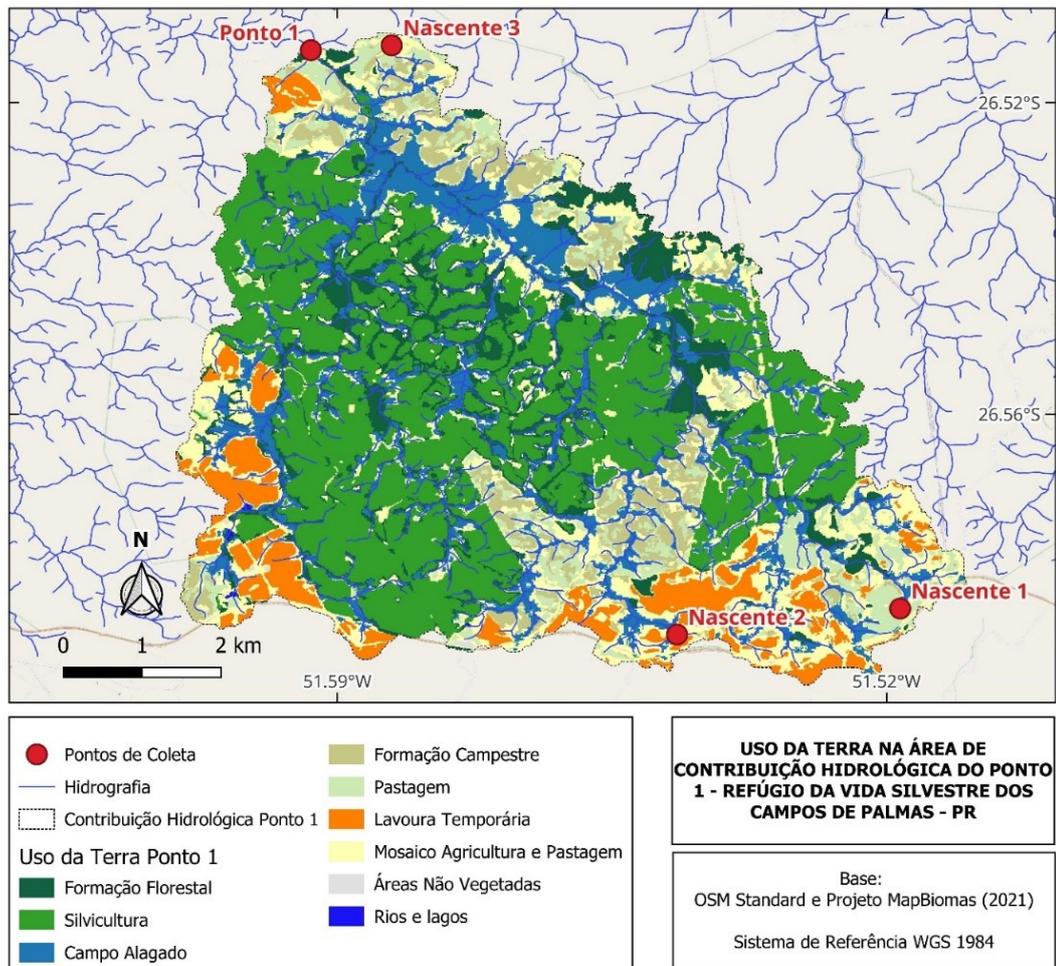
Figura 5 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica da Nascente 3 (N3)



Fonte: Autoria própria (2024)

O Ponto 1 (P1) dentro do RVS-CP (Figura 6), está em um local em que a ocupação do solo é bastante heterogênea, sendo composta predominantemente por silvicultura (35,98%), mosaico de agricultura e pastagem (19,35%), campos alagados (12,71%) e florestas (12,56%) (Tabela 2). Áreas como lavouras temporárias (6,9%), pastagem (6,47%) e vegetação campestre (5,86%) também estão presentes na área da contribuição hidrológica de P1, porém em menor proporção.

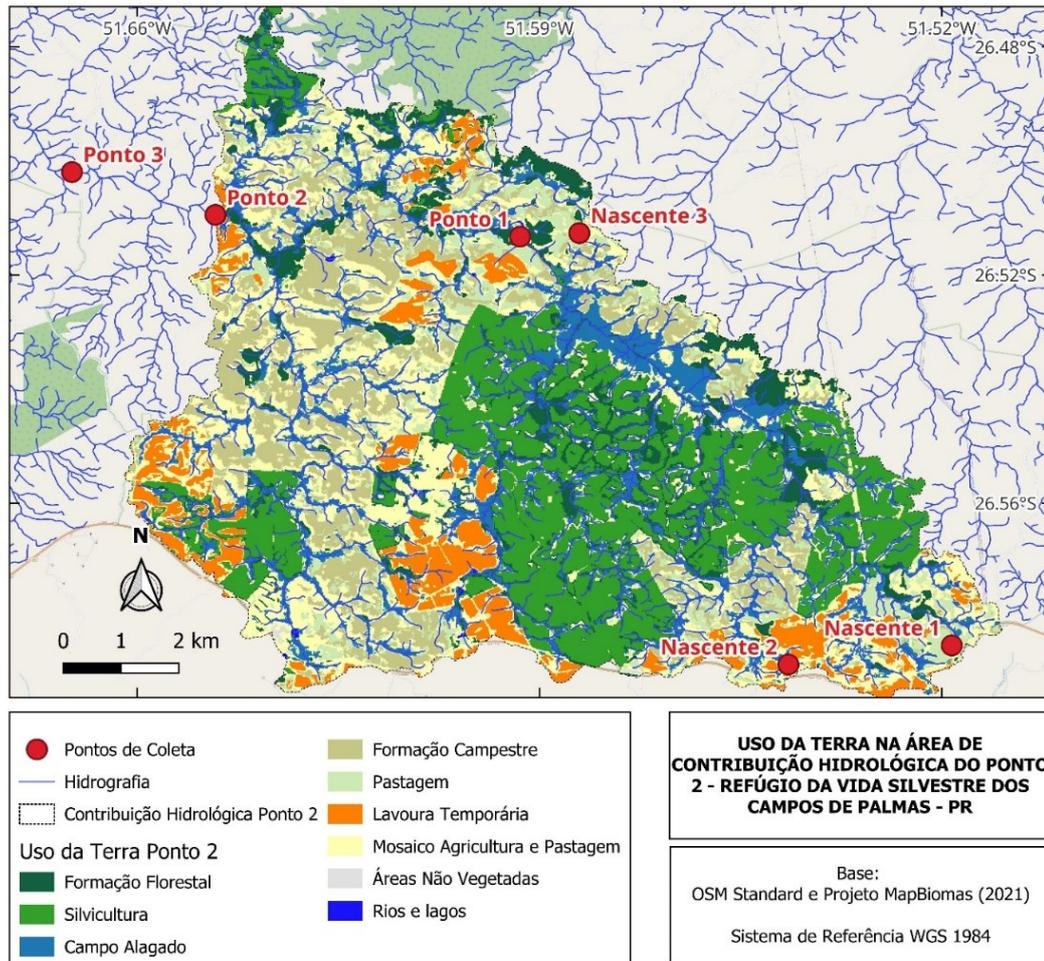
Figura 6 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica do Ponto 1 (P1)



Fonte: Autoria própria (2024)

O Ponto 2 (P2), dentro do RVS-CP (Figura 7), além da própria contribuição hidrológica, acaba abrangendo toda a área de contribuição de P1. Com isso, nota-se também uma heterogeneidade nos usos do solo, onde se encontra grandes áreas mescladas de agricultura e pastagem (26,95%) e silvicultura (22,46%) (Tabela 2). As demais áreas estão em proporções menores, como a vegetação campestre (12,7%), os campos alagados (11,34%), a área florestal (11,16%), as áreas de lavouras temporárias (7,67%) e pastagens (7,52%). Um fato válido que deve ser ressaltado é que neste ponto do rio há corredeiras que, devido a agitação, proporcionam a oxigenação da água.

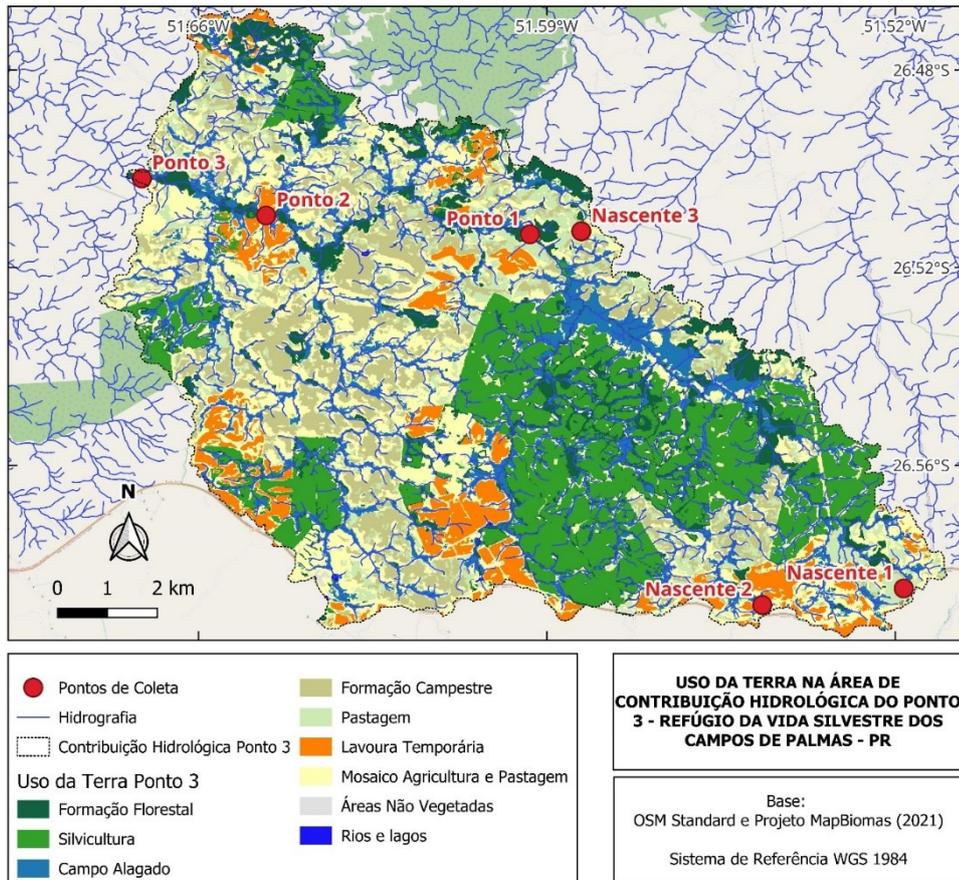
Figura 7 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica do Ponto 2 (P2)



Fonte: Autoria própria (2024)

O Ponto 3 (P3) é o último ponto ainda dentro dos limites do RVS-CP (Figura 8). Ele está bem próximo à área habitada por uma família e o uso da terra na área de contribuição hidrológica é bastante similar ao uso da terra de P2, sendo composto por 29,49% de mosaico de agricultura e pastagem, 20,25% de silvicultura, 12,94% de formação campestre, 11,45% de campo alagado, 11,32% de formação florestal, 8,13% de pastagens e 7,23% de lavouras temporárias (Tabela 2).

Figura 8 – Uso da terra na área de contribuição hidrológica do Ponto 3 (P3)



Fonte: Autoria própria (2024)

O Ponto 4 (P4) está situado além dos limites do RVS-CP, onde foram observadas áreas com formação campestre e florestal, incluindo a presença de araucárias e áreas de cultivo de pinus. Como mencionado anteriormente, P4 está localizado fora da área de conservação (Figura 2), sendo, portanto, o ponto de controle da região externa da UC. Ele sofre influência da região a jusante da bacia, que engloba uma variedade de usos de terra, resultando em uma ampla área de captação hidrológica tanto dentro quanto fora da UC. Esses fatores dificultam a análise para determinar o uso predominante da terra, e sabendo disso, optou-se por não realizar a confecção do mapa desse ponto.

Ao observar a Tabela 3 é possível ver a crescente contribuição hidrológica dos pontos de coleta, visto que o próximo ponto engloba, além da sua região, a região do ponto anterior. Nesse caso, P1 contribui hidrológicamente com o Refúgio cerca de 34,64%, P2 com 67% e P3 com aproximadamente 79,3%.

Tabela 3 – Contribuição hidrológica dos pontos de coleta das amostras de água e sedimento do Rio Chopim

| | Contribuição hidrológica (hectares) | % de contribuição dentro do RVS-CP |
|-----------|--|---|
| N1 | 10,91 | 0,07 |
| N2 | 2,42 | 0,01 |
| N3 | 7,9 | 0,05 |
| P1 | 5744,05 | 34,64 |
| P2 | 11109,26 | 67,00 |
| P3 | 13149,08 | 79,30 |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Fonte: Autoria própria (2024)

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas das águas foram realizadas de acordo com "Standard Methods" (APHA, AWWA e WEF, 1998, 2014 a, b), abrangendo os seguintes parâmetros: pH, oxigênio dissolvido, turbidez, cor, fósforo, fosfato, nitrogênio, demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio.

Os valores foram comparados com a Resolução Brasileira do CONAMA nº 357/2005 (Brasil, 2005), que dispõem sobre a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METAIS

Foram determinados os metais alumínio, chumbo, cobre, cromo total, manganês e zinco das amostras de água e sedimentos. As concentrações elementares foram determinadas pela técnica de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF) no Laboratório A3Q de Cascavel (PR).

Os valores foram comparados com a Resolução Brasileira do CONAMA nº 357/2005 (Brasil, 2005) para as amostras de água, a qual dispõe sobre a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, e a Resolução Brasileira do CONAMA nº 454/2012 (Brasil, 2012) para as amostras de sedimentos, que estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AGROQUÍMICOS

Das amostras de água foi determinado o teor do agroquímico 2,4-D, por Cromatografia Líquida de Alta Performance (modelo *UltiMate 3000*, Thermo Scientific), em coluna C18, utilizando o *software* de cromatografia Chromeleon™, baseado nos trabalhos de Primel et al. (2005), Caldas et al. (2011), Gabardo (2015), Marsolla (2015) e Bressiani et al. (2022).

A determinação dos resíduos de agroquímicos nas amostras de sedimentos foram realizadas empregando o método QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas no Laboratório de Análises de Resíduos e Pesticidas da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Os valores obtidos para cada amostra foram comparados com a Portaria de Consolidação (PCR) nº 5, de 28 de setembro de 2017, Anexo XX, a qual dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano.

4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS

Para a determinação do teor de hormônios estrógenos das amostras de água foi realizada a extração em fase sólida e eluídas em solventes para leitura em Cromatografia Líquida de Alta Performance (modelo *UltiMate 3000*, Thermo Scientific), em coluna C18, utilizando o *software* de cromatografia Chromeleon™, de acordo com metodologias de Liu e Liu (2004), Verbinnen, Nunes e Vieira (2010) e Petrie, Barden e Kasprzyk-Hordern (2015), com modificações.

Ainda não existe limite de valores máximos padronizados para a concentração de hormônios estrógenos em corpos hídricos. Entretanto, o Projeto de Lei nº 4541/2020 está em tramitação no congresso brasileiro, a fim de que o Poder Executivo estabeleça os limites de concentração de estrogênios em redes de água e esgoto, de forma que a presença dos hormônios nas estações de tratamento de esgoto e na água potável para abastecimento público não seja prejudicial à saúde e ao meio ambiente (Brasil, 2020).

4.7 TESTES DE ECOTOXICIDADE

4.7.1 Preparo das amostras

As amostras de água foram utilizadas da forma que chegaram ao laboratório, sendo descongeladas e homogeneizadas somente antes do seu uso, sem nenhum tipo de tratamento prévio.

As amostras de sedimentos seco (250 g) foram solubilizadas em 1000 mL de água destilada. Em seguida, agitou-se mecanicamente por 5 minutos e deixou-se em repouso por sete dias. Após esse período de decantação dos sólidos, o sobrenadante foi removido e filtrado em membrana de 0,45 mm para a obtenção do extrato contendo substâncias solúveis em água (ABNT NBR 10006, 2004). As amostras foram divididas em alíquotas e congeladas até o momento do seu uso.

4.7.2 Teste de imobilidade/mortalidade com *A. salina*

O teste de imobilidade/mortalidade com o microcrustáceo *A. salina* foi realizado conforme o método proposto por Guerra (2001) com modificações embasadas na ABNT NBR 13373 (2010). O teste iniciou-se com a indução da eclosão dos cistos de *A. salina*, que foram incubados em solução de sal marinho sintético (30 g L⁻¹), aerados, com luminosidade e à 25°C por 48h. Após a eclosão dos cistos, os náuplios foram transferidos para placas de cultivo de 24 poços, onde cada poço era composto por 10 náuplios e 2 mL de cada amostra nas diferentes concentrações (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,2% e 3,1%), preparadas pela diluição em solução salina. O controle negativo (CO-) foi realizado com sal marinho diluído em água mineral nas mesmas concentrações dos tratamentos. E o controle salino (CS) foi realizado com 2 mL de solução salina.

Após, as placas foram incubadas por 24 horas e, a contagem da quantidade de náuplios imóveis/mortos foi realizada. A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade, variância ANOVA e de comparação de médias de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$; $n=4$), pelo programa *Action Stat*.

4.7.3 Teste de fuga com *E. fetida*

O teste de fuga com a minhoca *E. fetida* foi realizado conforme a norma NBR ISO 17512-1 (ABNT, 2011) e protocolo ISO (2008). As minhocas utilizadas apresentavam clitelo bem desenvolvido e massa corporal individual entre 300 e 600 mg. Para o solo, foi feita uma adaptação do solo artificial tropical (SAT) proposto pela OECD (1984), isto é, uma mistura de 70% areia fina, seca e peneirada, 20% caulim em pó e 10% fibra de coco. A umidade foi ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção de água, com água filtrada no solo controle (CO-), as soluções tratamento (amostras de água e sedimento) no solo-teste e solução de ácido bórico (H₃BO₃) no controle positivo (CO+) (750 mg H₃BO₃ kg⁻¹ de solo).

Os recipientes que foram utilizados eram frascos retangulares de polipropileno, com altura de 115 mm e dimensões de 175 x 132 mm. A tampa dos recipientes foi furada e o volume interno foi dividido ao meio com a adição de um divisor plástico removível. Um dos lados do recipiente foi preenchido com 300 g de solo controle (SAT + água) e a outra metade com a mesma quantia de solo-teste (SAT + Pontos) ou solo controle positivo (SAT + H₃BO₃). Após isso, o divisor plástico foi retirado e então, 10 minhocas foram introduzidas na linha divisória entre os dois solos que estão no recipiente. Foram realizadas duas repetições para cada experimento.

Os recipientes foram mantidos no escuro durante 48h e então recolocou-se o divisor de plástico, separando os solos controle e teste. Em seguida, foi feita a contagem dos organismos em cada seção dos recipientes.

Como método de validação do ensaio, realizou-se o teste de controle dual, onde o solo controle (CO-) foi adicionado em ambas seções do recipiente. Para ser validado, as minhocas deverão se distribuir de maneira homogênea e a taxa de mortalidade, durante o tempo do ensaio, deverá ser inferior a 10% em cada recipiente.

A análise dos dados foi realizada em termos de porcentagem de fuga, a qual foi calculada pela Equação 1.

$$\% = \frac{n_C - n_T}{N * 100} \quad (1)$$

Onde:

% porcentagem de fuga;

n_C número de minhocas encontradas na seção B (solo-controle);

n_T número de minhocas encontradas na seção A (solo-teste);

N número total de minhocas (soma das replicatas por efluente).

O solo é considerado tóxico quando mais de 80% dos organismos possuem preferência pelo solo controle (fuga >60%). Respostas negativas, no caso em que minhocas venham a preferir o solo-teste, são consideradas como 0% de fuga.

Para verificação da significância das respostas de fuga foi usado o teste estatístico de Fisher unicaudal, com os dados da média mais ou menos o desvio

padrão do número de organismos encontrados em cada seção do recipiente, de cada tratamento e do controle dual, utilizando o programa *Action Stat*.

4.7.4 Teste de citotoxicidade e mutagenicidade com *A. cepa*

Os bulbos de *A. cepa* foram obtidos de fonte comercial, escarificados para a retirada de catáfilos mortos e colocados para enraizar em frascos com água mineral (controle negativo), solução de paracetamol 1 g/L (controle positivo), controle branco (apenas para as amostras de sedimentos, nas quais um lote do processo de preparação foi conduzido sem a adição do sedimento) e as soluções tratamento (amostras de água e sedimento), à temperatura ambiente e no escuro. As cebolas permaneceram em contato com as soluções por 120 horas (cinco dias) para o enraizamento, sendo essas soluções trocadas todos os dias. Foram realizadas cinco repetições para cada grupo controle e tratamento.

Após esses cinco dias, coletou-se três raízes de cada cebola, as quais foram fixadas em solução de metanol e ácido acético (3:1). As raízes foram preparadas pela reação de Feulgen. Passado as 24h em contato com o fixador na geladeira, as raízes foram lavadas com água destilada e levadas em estufa a 60°C, por 10 minutos, com 5 mL de ácido clorídrico 1N a 60 °C para sofrerem a hidrólise. Em seguida, foram lavadas novamente com água destilada e então coradas com 5 mL do reativo de Schiff por 45 minutos no escuro. Para o preparo das lâminas, foi utilizada a região meristemática das raízes, a qual foi macerada com orceína acética e coberta com uma lamínula (Fiskesjö, 1985).

As lâminas foram analisadas utilizando o teste "cego" em microscópios de luz, na objetiva de 40x. Foram contadas mil células de cada bulbo, totalizando cinco mil células de cada grupo controle ou tratado, diferenciando-as de acordo com suas fases no ciclo celular mitótico (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase). Além disso, foram avaliadas também as células com anomalias ou alterações estruturais, como: micronúcleos (MN), metáfases-desorganizadas, metáfases colchicínicas, metáfases com aderência, cromossomos soltos, anáfases desorganizadas, anáfases com ponte, anáfases com cromossomos soltos, anáfases fragmentadas e telófases com ponte.

Para a determinação da citotoxicidade, foi realizado o cálculo do Índice Mitótico (IM%) (Equação 2). Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade e

variância ANOVA, seguido da análise de comparação de médias de Tukey ($n=5$, $\alpha=0,05$), por meio do programa *Action Stat*.

$$\text{IM\%} = [(\text{número de células em divisão})/(\text{número total de células analisadas})] \times 100 \quad (2)$$

Para a determinação da mutagenicidade, foi realizado o cálculo do Índice de Mutagenicidade (IMG%) (Equação 3). Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade e variância ANOVA, seguido do teste de comparação de médias de Tukey ($n=5$, $\alpha=0,05$), por meio do programa *Action Stat*.

$$\text{IMG\%} = [(\text{número de células alteradas})/(\text{número total de células analisadas})] \times 100 \quad (3)$$

4.7.5 Teste de citotoxicidade do MTT com células de fígado humano

O ensaio de citotoxicidade do MTT foi realizado de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. As células de fígado humano (HUH7.5) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços onde foram cultivadas 1×10^5 células/poço. Após estabilização por 24 horas, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100 µL de meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanosulfonato (MMS – 150 µM), (controle positivo - CO+) e tratamentos com as concentrações de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v, amostra/meio) das amostras filtradas de água e sedimento do Rio Chopim.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o tratamento foi substituído por meio de cultura contendo de MTT (0,167 mg/mL). As placas foram incubadas por mais quatro 4 horas antes do descarte desse meio, seguido da adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 560 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram apresentados como percentuais de viabilidade celular, estimados por meio da Equação 4.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

$|ABS_T|$ = Absorbância do tratamento;

$|ABS_{CO-}|$ = Absorbância do controle negativo.

A análise estatística dos valores médios das absorbâncias foi realizada pelo teste de normalidade e variância ANOVA, seguida do teste de comparação de médias de Dunnet ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$; $n = 4$), por meio do programa *Action Stat*.

4.8 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise dos componentes principais foi realizada utilizando o programa *Past 4.03*. Para a análise estatística e montagem de matrizes de dados os resultados das análises físico-químicas, teores de metais, agroquímicos, hormônios e de cada teste ecotoxicológico (separadamente) foram analisados para as amostras de água e sedimento (separadamente). Os valores foram expressos em diagramas de dispersão utilizando as componentes principais 1 e 2, com os valores de Eigen e os dados das variáveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os dados das análises físico-químicas das amostras de água do Rio Chopim (Tabela 4) mostram que os parâmetros de turbidez e fósforo estão dentro do estabelecido pela Resolução do CONAMA nº 357/2005 em todos os pontos de coleta. De forma contrária, para o oxigênio dissolvido, os pontos N1, P1, P3 e P4 apresentam valores abaixo do estabelecido pela legislação ($> 5 \text{ mg O}_2/\text{L}$), sendo $4,250 \text{ mg O}_2/\text{L}$, $4,960 \text{ mg O}_2/\text{L}$, $4,120 \text{ mg O}_2/\text{L}$ e $4,380 \text{ mg O}_2/\text{L}$, respectivamente. Apesar dos resultados não estarem muito abaixo do limite estabelecido pela legislação, concentrações de OD na faixa de $4 \text{ mg O}_2/\text{L}$ podem limitar a presença de alguns peixes, além de interferir na oxidação de contaminantes passíveis de serem degradados por vias oxidativas (Armas et al., 2007). Esses valores podem estar associados a diversos fatores, desde o índice pluviométrico até o descarte de efluentes agrícolas e domésticos, visto que ambas as atividades se fazem presentes nessas regiões da UC e, consomem grande quantidade do oxigênio disponível.

Tabela 4 – Análises físico-químicas das amostras de água do Rio Chopim no RVS-CP

| | N1 | N2 | N3 | P1 | P2 | P3 | P4 | CONAMA 357/2005** |
|--|-------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--|
| pH | 6,20 | 6,10 | 6,58 | 6,78 | 6,63 | 5,98* | 5,78* | 6,0 a 9,0 |
| OD ($\text{mg O}_2/\text{L}$) | 4,25* | 5,89 | 5,36 | 4,96* | 5,67 | 4,12* | 4,38* | Acima de 5 $\text{mg O}_2/\text{L}$ |
| Turbidez (FTU) | 0,12 | 7,25 | 6,15 | 4,43 | 3,32 | 3,56 | 2,21 | Até 100 FTU |
| Cor (mgPtCo/L) | 54,54 | 175,27* | 153,14* | 128,99* | 110,88* | 124,97* | 94,78* | Até 75 mg Pt Co/L |
| Fósforo (mg/L) | 0,01 | 0,01 | 0,012 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | Até 0,05 mg/L |
| Fosfato (mg/L) | 0,10 | 0,10 | 0,12* | 0,10 | 0,15* | 0,11* | 0,20* | Até 0,100 mg/L |
| Nitrogênio (mg/L) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | Até 2,18 mg/L |
| DQO ($\text{mg O}_2/\text{L}$) | 7,79 | 6,68 | 3,36 | 7,79 | 6,68 | 7,79 | 7,79 | ND |
| DBO ₅ ($\text{mg O}_2/\text{L}$) | 6,59* | 4,32 | 2,12 | 5,97* | 3,99 | 5,95* | 4,46 | $< 5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP; OD: oxigênio dissolvido; DQO: demanda química de oxigênio; DBO₅: demanda bioquímica de oxigênio. ND: Não definido. *Valores fora dos padrões. **Classe 2: águas doces.

Fonte: Autoria própria (2024)

O estudo realizado por Almeida et al. (2022) também apresentou concentrações baixas de oxigênio dissolvido em um ponto de coleta das águas do Rio Pirapozinho, São Paulo, Brasil. Essas baixas concentrações de OD, que variaram entre 2,90 mgO₂/L e 3,10 mgO₂/L, foram justificadas com a alta presença de contaminantes de fósforo e nitrogênio, visto que as concentrações elevadas desses nutrientes estimulam o processo de eutrofização no rio, aumentando significativamente o número de plantas aquáticas, o que, conseqüentemente, acaba causando uma ausência de peixes no local.

Resultado semelhante ocorreu para os pontos P3 e P4 do presente estudo, que além de baixo OD apresentaram elevados teores de fósforo na forma de fosfato (PO₄⁻³). Além destes pontos, os pontos N3 e P2 também apresentaram concentração de fosfato acima do estabelecido pela Resolução (< 0,100 mg/L). Analisando a contribuição hidrológica destes pontos de coleta (Tabela 2), que é predominantemente de mosaico de agricultura e pastagem (N3: 51,15%, P2: 26,95%, P3: 28,49%), é provável que o uso de fertilizantes e produtos que auxiliam no crescimento e desenvolvimento de plantas desta região, que têm em sua composição diferentes macro e micronutrientes, sendo um deles o fósforo, tenha contribuído para o aumento do fosfato nestes pontos de coleta de água.

Corroboram com esses dados o estudo realizado por Neto et al. (2012), o qual avaliou a balneabilidade das águas do Balneário Veneza, pertencente à Bacia Hidrográfica do Rio Itapecuru, na cidade de Caxias, Maranhão. Por meio das análises dos parâmetros físico-químicos, todos os pontos estudados apresentaram concentrações de fosfato acima do estabelecido por lei, variando entre 0,139 mg/L até 0,185 mg/L. Os autores reforçam que os valores elevados desse nutriente podem acabar gerando a eutrofização, visto que o aumento dele faz com que o ecossistema produza mais do que consome, causando desequilíbrio e trazendo conseqüências para o metabolismo do ecossistema.

Em relação ao nitrogênio, em todos os pontos analisados, a concentração foi de 0,00 mg/L, estando dentro do valor máximo permitido pela legislação do CONAMA nº 357/2005 (< 2,18 mg/L). No estudo de Schöninger (2020), também com amostras de água do Rio Chopim na região do RVS-CP, o nitrogênio apresentou concentrações que variaram de 0,18 mg/L até 1,37 mg/L, mas que ainda estavam dentro dos parâmetros permitidos por lei, indicando a interferência pontual de poluição nos pontos de amostragem.

Em relação a cor, com exceção do ponto N1 (54,540 mg Pt Co/L), os demais pontos apresentaram valores acima do estabelecido pela legislação (< 75 mg Pt Co/L), variando entre 94,785 e 175,275 mgPtCo/L. De acordo com Scorsafava et al. (2010), esse parâmetro fornece evidências de possível contaminação, como a presença de partículas sólidas em suspensão, material orgânico e/ou inorgânico, além de uma concentração significativa de ferro. A cor varia conforme a presença de substâncias dissolvidas, sendo azulada quando pura, avermelhada quando rica em ferro e amarelada quando rica em ácidos húmicos (Silva et al., 2021). Além disso, é importante destacar que a cor está diretamente relacionada à turbidez, ou seja, quanto maiores forem os valores de cor, maiores serão os valores de turbidez, corroborando com os dados apresentados na Tabela 4. Isso indica que a presença de partículas em suspensão, responsáveis pela turbidez, influencia no aumento da cor. Além disso, a turbidez pode ser afetada pela presença de areia e microrganismos em geral, estando associada à contaminação biológica da água. Portanto, quanto maior a turbidez, maior será o aumento da matéria orgânica na água e, conseqüentemente, maiores serão as chances de contaminação por parasitas e bactérias (Silveira e Lopes, 2022). Com relação ao uso e ocupação do solo da região de contribuição hidrológica da N1 (Tabela 2), pode-se observar que é uma região com pouca influência de agricultura ou outro cultivo, como silvicultura. Desta forma, o solo pode estar sendo pouco revolvido e assim, resultado no menor carregamento de partículas para esta nascente do Rio Chopim e, assim, menor turbidez e cor.

Similarmente, o estudo de Teles et al. (2022), que realizou a análise da qualidade das águas do Rio Mogi-Guaçu, também apresentou valores de cor acima do padrão de qualidade da Resolução (entre 80,3 mg Pt Co/L e 100,6 mg Pt Co/L). Nesse caso, os autores justificaram que a cor está diretamente relacionada com os teores de sólidos totais dissolvidos, os quais acabam indicando uma carga poluidora nas águas do Rio Mogi-Guaçu, como decomposição de matéria orgânica da água, pelas algas ou pela introdução de esgotos industriais e domésticos.

Quanto ao pH, apenas os pontos P3 e P4 apresentaram valores menores que o limite permitido pela resolução (entre 6,0 a 9,0), apresentando pHs de 5,98 e 5,78, respectivamente. São inúmeros os fatores que podem influenciar nesse parâmetro, como fontes naturais (fotossíntese, oxidação de matéria orgânica, dissolução de rochas, absorção de gases da atmosfera, presença de algas, entre outros) ou fontes

antropogênicas (despejos domésticos, agrícolas e industriais), além de poder variar naturalmente com o decorrer do rio (Piratoba et al., 2017; Silveira e Lopes, 2022). De modo geral, segundo Piratoba et al. (2017), em rios de águas brancas, com nascentes em locais montanhosas, o pH varia entre 6,2 e 7,2; já os rios de águas claras, que são os que nascem em locais de baixo relevo e carregam pouca matéria orgânica, geralmente apresentam valores que oscilam entre 4,5 e 7,8; ao passo que os rios de águas pretas, caracterizados por carregarem grande quantidade de substâncias orgânicas dissolvidas, possuem um pH variável entre 3,8 e 4,9. Dessa forma, apesar de dois pontos terem apresentado valores abaixo do permitido pela resolução, ainda estão dentro do esperado para os rios de águas claras.

Com relação a DBO_5 , o qual apresenta um limite de até 5 mg O_2/L para a Classe II de águas doces do CONAMA (Brasil, 2005), os pontos N1, P1 e P3 também apresentaram valores acima do permitido, com valores de 6,596 mg O_2/L , 5,967 mg O_2/L e 5,951 mg O_2/L , respectivamente. Apesar das amostras não apresentarem valores muito extrapolados do permitido, já é possível identificar um excesso de matéria orgânica presente nesses pontos, que geralmente são oriundas das atividades agrícolas, agropecuárias e despejos de efluentes domésticos (Narciso et al., 2021). Os pontos P1 e P3 enquadram-se neste contexto, pois possuem contribuição hidrológica (Tabela 2) principalmente de mosaico de agricultura e pastagem (P1: 19,35%; P3: 28,49%) e silvicultura (P1: 35,98%; P3: 20,25%). Entretanto, além dos fatores já mencionados para o aumento da DBO_5 , há também a possibilidade da presença de substâncias de origem animal, substâncias orgânicas biodegradáveis (plantas em decomposição) e produtos químicos orgânicos. Neste caso, pode ser que a N1 esteja sendo afetada pela presença de animais na região, uma vez que é uma área com contribuição predominante de pastagem (Tabela 2).

O estudo realizado por Schöninger (2020), que avaliou amostras coletadas na região dos Pontos N3, P1 à P4 do presente estudo, nos anos de 2018 e 2019, os resultados para DBO_5 ficaram acima do limite da legislação em todos os pontos e estações de coleta, chegando a atingir valores de até 99,38 mg O_2/L . Entretanto, os altos valores de DBO_5 obtidos no estudo de Schöninger (2020) não afetaram o OD presente na água, diferentemente do atual trabalho, o qual teve os valores de OD comprometidos (abaixo do permitido) nos mesmos pontos que a DBO_5 ultrapassou o valor da resolução, com exceção de P4.

Sobre a DQO, é conhecido como um parâmetro que avalia o potencial poluidor dos efluentes domésticos e industriais, bem como seu impacto nos ecossistemas aquáticos (Braga e Lopes, 2015). Ao analisar a tabela, é possível observar a presença de matéria orgânica na água, visto que as concentrações variam de 3,359mg O₂/L a 7,792 mg O₂/L. Os valores de DQO foram significativamente discrepantes em todos os pontos de coleta na pesquisa conduzida por Schöninger (2020), também realizada no Rio Chopim, na região do RVS-CP, com valores de DQO variando, em média, entre 85,62 mgO₂/L e 198,96 mgO₂/L. Ao considerar a relação entre DQO e DBO₅, constatou-se que apenas em P4 essa relação foi de 1,7, seguida por 1,67 em P2. De acordo com Ferreira et al. (2012), uma relação entre 1,7 e 2,4 sugere poluição por esgoto doméstico, enquanto que os dejetos industriais apresentam uma variação mais ampla. Então, levando em conta que o aumento de DBO₅ está relacionado a descargas de origem orgânica, e DQO a descargas de origem industrial, os resultados sugerem que a água do P4 está, possivelmente, sofrendo influência de esgoto doméstico.

5.2 ANÁLISE DE METAIS

Para as amostras de água, somente o cobre, em todos os pontos de coleta, e o manganês na N2 (Tabela 5) apresentaram concentrações acima do estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005. Resultado semelhante foi obtido por Schöninger (2020), em que os pontos N3, P1 à P4 do presente estudo apresentaram teores de cobre acima da legislação nas estações do inverso e primavera. Ao mesmo tempo, estes pontos também não apresentaram os metais Pb, Cr, e Zn acima dos limites da legislação nas quatro coletas realizadas. Considerando a predominância de pastagem, agricultura e silvicultura nos pontos de coleta do presente estudo (Tabela 2) é de se esperar o uso de fertilizantes e agroquímicos na região, que possuem em suas composições metais, como o cobre o manganês, que podem ter aumentado a concentração destes metais nas amostras de água (Tabela 5).

O estudo de Aguillar et al. (2020), analisando a presença de cinco tipos de metais (Cd, Pb, Cu, Ni e Cr) nas águas do Rio Parnaíba, Minas Gerais, confirmaram valores acima do permitido por lei de cobre e chumbo. Os autores afirmam que tais resultados de contaminação podem ter sido gerados pelo fato dessas áreas serem

de grande produção agrícola e não possuírem tratamento adequado de esgotos e resíduos urbanos.

Tabela 5 - Concentrações médias de metais das amostras de água (mg/L) e sedimentos (mg/kg) do Rio Chopim no RVS-CP

| Elementos | Al | Pb Total | Cu | Cr Total | Mn Total | Zn Total |
|---------------------------|----------------|----------|---------|----------|-----------|----------|
| Água (mg/L) | | | | | | |
| N1 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | <0,009 | <0,011 |
| N2 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | 0,1870* | <0,011 |
| N3 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | <0,009 | <0,011 |
| P1 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | <0,009 | <0,011 |
| P2 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | <0,009 | <0,011 |
| P3 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | <0,009 | <0,011 |
| P4 | <0,015 | <0,010 | <0,011* | <0,008 | <0,009 | <0,011 |
| CONAMA 357/2005** | < 0,100 | < 0,010 | < 0,009 | < 0,050 | < 0,100 | < 0,180 |
| Sedimentos (mg/kg) | | | | | | |
| N1 | 26.113,53 1 | 11,372 | 3,03 | 2,464 | 105,38 | 28,24* |
| N2 | 6.967,068 | 4,259 | 2,29 | <1,823 | 61,19 | 12,67* |
| N3 | 12.829,28 5 | 7,184 | 2,57 | <1,823 | 286,35 | 20,53* |
| P1 | 33.636,91 8 | 30,857 | 8,31 | 7,391 | 339,80 | 43,24* |
| P2 | 56.729,53 3 | 17,406 | 6,31 | 5,547 | 1.912,395 | 51,84* |
| P3 | 52.480,88 3 | 25,427 | 13,36 | 6,310 | 216,96 | 52,71* |
| P4 | 32.970,51 4 | 32,588 | 10,04 | 3,517 | 218,91 | 28,04* |
| CONAMA 454/2012*** | ND | < 35,0 | < 35,7 | < 37,7 | ND | < 12,3 |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP; Al: Alumínio; Pb: Chumbo; Cu: Cobre; Cr: Cromo; Mn: Manganês; Zn: Zinco; ND: Não definido.

***Valores fora dos padrões; **Valores máximos. Classe 2: águas doces; ***Material a ser dragado em água doce. Nível 1.**

Fonte: Autoria própria (2024)

Com relação as amostras de sedimentos (Tabela 5), destaca-se às concentrações de zinco total, as quais todas ficaram acima dos padrões estabelecidos pela Resolução do CONAMA nº 454/2012 (<12,3 mg/kg), variando entre 12,67 mg/kg e 52,71 mg/kg. Este resultado corrobora com o estudo de Schöninger (2020) pois, nas quatro coletas realizadas pelo autor, o teor de zinco estava acima do limite estabelecido pela legislação para todos os pontos de coleta de água do Rio Chopim. De acordo com Bezerra, Batista e Silva (2018), elevadas concentrações de zinco podem ser atribuídas à sua ampla utilização em fertilizantes nas áreas agrícolas.

As concentrações de cromo total e cobre se mostraram baixas em relação ao permitido, assim como, as concentrações de chumbo total, com ressalvas aos pontos P1 (30,857 mg/kg) e P4 (32,588 mg/kg) que indicaram concentrações próximas ao limite máximo estabelecido (< 35 mg/kg). O estudo de Viana et al. (2020), que analisou as concentrações de metais no sedimento dos córregos presentes na Microbacia do Tarumã (Mato Grosso do Sul, Brasil), mostrou que todos os pontos apresentaram concentrações de metais abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira do CONAMA nº 454/2012, para nível I de qualidade de água, no qual há uma baixa probabilidade de efeitos adversos à biota. Entretanto, os autores ainda afirmam que, mesmo abaixo dos limites permitidos, os metais Cd, Pb e Cr são biotóxicos, ou seja, mesmo que em pequenas proporções nos sedimentos, são elementos não essenciais aos processos biológicos, podendo causar riscos ecológicos, de potencial bioconcentrador nos organismos, provocando danos ecotoxicológicos para a biota aquática.

Em relação ao alumínio e manganês, apesar de não terem limites definidos, nota-se altas concentrações destes metais em N1, N3, P1, P3 e P4 (alumínio) e P2 (alumínio e manganês). Este resultado é bem acima do encontrado no estudo de Barros et al. (2021), que detectaram uma concentração média de 3,9 mg/kg de manganês nos sedimentos do mangue da Foz do Rio Meirim, em Maceió, Alagoas. Entretanto, esses elementos estão presentes nas rochas que constituem o solo do Planalto de Palmas e, conseqüentemente, podem compor o sedimento naturalmente (Alves et al., 2010).

5.3 AGROQUÍMICOS

Nas amostras de águas não foi possível detectar a presença do agroquímico 2,4-D, apesar de ser o segundo agroquímico mais vendido no Brasil (Matias et al., 2020). Esse resultado é um ponto positivo, visto que esse herbicida é comumente encontrado em águas de rios, como o caso do estudo de Pinheiro et al. (2012), onde foi detectado a presença do 2,4-D em altas concentrações (74,5 µg L⁻¹) nas águas superficiais da bacia do Rio Itajaí, em Santa Catarina. Essa concentração foi encontrada em uma região localizada próximo a cidades pequenas de áreas rurais, ou seja, a atividade agrícola é frequente.

Os dados da Tabela 6 mostram que os pontos N1 e P4 foram os únicos que não indicaram presença de nenhum tipo de agroquímico nas amostras de

sedimentos, sendo que nos demais pontos foram detectados ao menos um tipo de defensivo agrícola. Este resultado é preocupante por se tratar de uma Unidade de Conservação de Proteção Integral e, porque duas das três nascentes avaliadas (N2 e N3) continham pelo menos um agroquímico, com destaque para a N3 que apresentou três deles (Tebuconazol, Trifloxistrobina e Tiametoxam). De acordo com a Tabela 2, é possível observar que todos os pontos que apresentaram agroquímicos nas amostras de sedimentos possuem como área de contribuição hidrológica majoritariamente agricultura e pastagem (N2, N3, P2, P3) e/ou silvicultura (P1, P2, P3), corroborando a presença destas moléculas nas amostras. Este resultado ainda corrobora os dados das análises físico-químicas (Tabela 4), pois a N1, que possui pouca influência de agricultura ou outro cultivo, apresentou os menores valores de turbidez e cor.

Co relação aos agroquímicos identificados nos sedimentos, o fungicida Tebuconazol foi encontrado em três pontos, sendo eles o N2, N3 e P3, todos na concentração de 0,017 mg/kg. O fungicida Trifloxistrobina se fez presente em dois pontos, N3 e P1, em concentrações de 0,008 mg/kg. Já o pesticida Tiametoxam e o fungicida Carbendazim foram observados em apenas um ponto, N3 (0,017 mg/kg) e P2 (0,033 mg/kg), respectivamente. De acordo com Schutz et al. (2023), fungicidas e inseticidas dos tipos estrobilurinas (caso do Trifloxistrobina), benzimidazóis (caso do Carbendazim), organofosforados, triazóis (caso do Tebuconazol) e carboxamidas são pulverizados em culturas de soja e batata, cultivares comuns no RVS-CP.

Entretanto, todos os agroquímicos foram identificados em concentrações menores que o valor máximo permitido (VMP), segundo a Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 – Anexo XX, com exceção do Tiametoxam e Trifloxistrobina que não possuem valores tabelados na PCR. Apesar disso, como destacado por Kronbauer et al. (2021), não é possível garantir baixos riscos para a saúde humana e ambiental mesmo que as concentrações tenham ficado abaixo do limite máximo permitido de segurança estabelecido pela legislação brasileira atual, uma vez que os agroquímicos têm comprovadamente efeitos agudos e crônicos, os quais são agravados pela constante exposição a essas substâncias.

Vale destacar que ambos os fungicidas encontrados nas amostras de sedimentos são amplamente usados na agricultura, principalmente de cereais, podendo causar danos à saúde humana, provocando irritações cutâneas, oculares e respiratórias, além de serem tóxicos aos microrganismos aquáticos, algas e peixes

(Prestes, Gibbon e Lansarin, 2010; Rocha et al., 2014; Albinati et al., 2016; Singh et al., 2016).

Tabela 6 – Agroquímicos detectados nas amostras de sedimento do Rio Chopim no RVS-CP

| Pontos | Agroquímicos | LoD (mg/kg) | LoQ (mg/kg) | VMP (mg/L) |
|--------|------------------|-------------|-------------|------------|
| N1 | nd | - | - | - |
| N2 | Tebuconazol | 0,005 | 0,017 | 0,18 |
| N3 | Tebuconazol | 0,005 | 0,017 | 0,18 |
| | Tiametoxam | 0,005 | 0,017 | ND |
| | Trifloxistrobina | 0,002 | 0,008 | ND |
| P1 | Trifloxistrobina | 0,002 | 0,008 | ND |
| P2 | Carbendazim | 0,010 | 0,033 | 0,12 |
| P3 | Tebuconazol | 0,005 | 0,017 | 0,18 |
| P4 | nd | - | - | - |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

LoD: Limite de detecção; LoQ: Limite de quantificação; VMP: Valor máximo permitido segundo PRC nº 5, de 28 de setembro de 2017, Anexo XX; ND: Não definido; nd: Não detectado.

Fonte: Autoria própria (2024)

Nas águas do Rio Taquari, localizado na cidade de Encantado, Rio Grande do Sul, Brasil, foram encontradas concentrações de agroquímicos (Kronbauer et al., 2021). Especificamente, foram identificados o herbicida Atrazina, os inseticidas Imidacloprido e Clorpirifós, e os fungicidas Carbendazim e Tebuconazol, os dois últimos também identificados no sedimento do presente estudo. A ausência destes agroquímicos nas amostras de água do Rio Chopim mostram que estes não foram pulverizados recentemente na região dos pontos de coleta. Entretanto, a presença deles nos sedimentos indicam que seu uso ocorreu, fazendo com que estas moléculas tenham ficado sedimentadas com o material de fundo do Rio, podendo ser eventualmente ressuspensas para as águas do Rio Chopim.

5.4 HORMÔNIOS

A quantificação dos hormônios E1, E2, EE2 e E3 nas amostras de águas do Rio Chopim estão apresentadas na Tabela 7. Em relação aos resultados obtidos somente nas nascentes N1 e N2 foi detectada a presença dos hormônios estrona (N1: 0,805 mg/L, N2: 0,021 mg/L) e etinilestradiol (N1: 0,099 mg/L). A presença desses estrógenos pode estar indicando uma sobrecarga de efluentes domésticos nessas nascentes, além de possivelmente existirem áreas com criação de animais localizados nas proximidades, causando a lixiviação de esterco animal ao corpo hídrico. De acordo com os dados da Tabela 2, estas nascentes possuem

contribuição hidrológica predominante de pastagem (N1: 76% de pastagem e 19,87% de mosaico de agricultura e pastagem; N2: 81,89% mosaico de agricultura e pastagem), o que corrobora com a presença de animais na região e, conseqüentemente, o aumento nos hormônios estrógenos E1 e E2 nas amostras em questão.

Tabela 7 – Concentrações (mg/L) de hormônios estrógenos detectados nas amostras de águas do Rio Chopim no RVS-CP

| | N1 | N2 | N3 | P1 | P2 | P3 | P4 |
|-----------------------|-------|-------|----|----|----|----|----|
| Estrona (E1) | 0,805 | 0,021 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Estradiol (E2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Etinilestradiol (EE2) | 0,099 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Estriol (E3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Fonte: Autoria própria (2024)

No estudo realizado por Andrade, Ferreira e Souza (2020), o qual teve por finalidade determinar concentrações de contaminantes emergentes nas águas do Rio Barigui, localizado no município de Curitiba, Paraná, foi confirmado a presença de cafeína e hormônios sexuais nos quatro pontos de coleta avaliados, incluindo os também identificados no presente (etinilestradiol: 0,18 µg/L e 168,8 µg/L, estrona: 0,098821 µg/L e 21,8 µg/L).

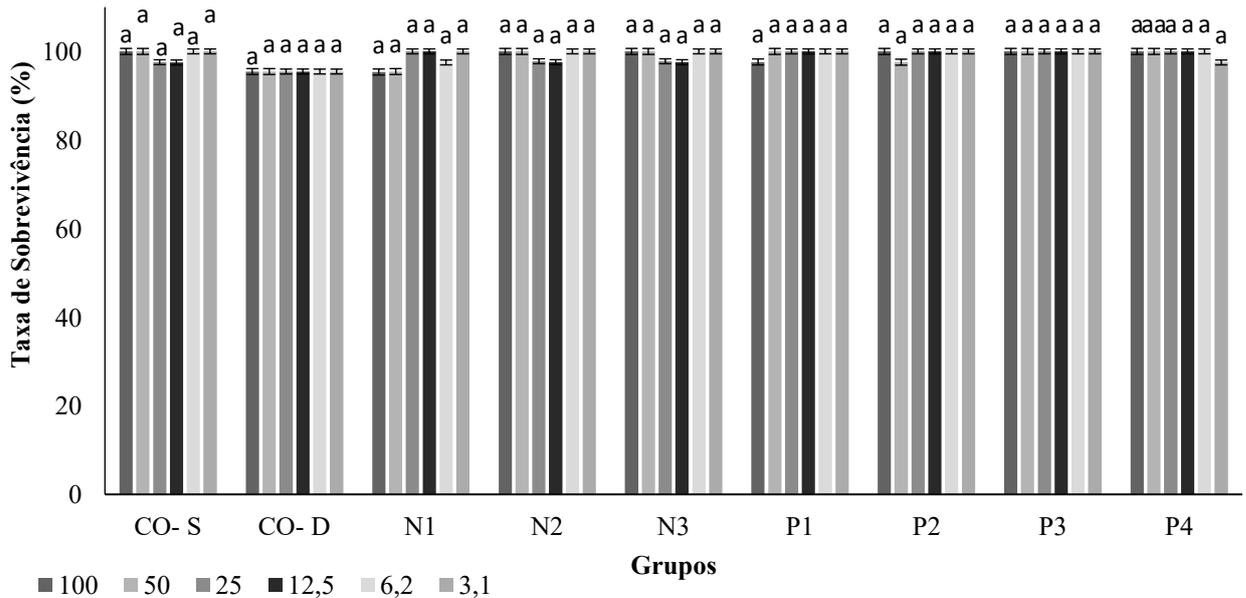
5.5 TESTES DE TOXICIDADE

5.5.1 *Artemia salina* L.

Os resultados do teste de imobilidade/mortalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* (Tabela 8) mostram que todas as amostras de água, nas diferentes concentrações avaliadas, não apresentaram efeito tóxico ao organismo teste, com taxas de sobrevivência próximas a 100% (Figura 9). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Mendes et al. (2011), analisando a qualidade das águas do Rio Marombas (Santa Catarina, Brasil), em que também foi constatada a presença de agroquímicos (caso dos pontos N2, N3, P1, P2 e P3 do presente estudo), mas ausência de toxicidade para *A. salina* (como todos os pontos avaliados do presente trabalho). Restrepo et al. (2019) também realizou um estudo similar ao avaliar a qualidade das águas do Rio da Trincheira, localizado no município de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil, através de análises físico-químicas e bioensaios.

As análises físico-químicas também apresentaram alterações em alguns parâmetros como DBO₅ e OD (semelhante aos pontos N1, P1, P3, P4), mas o teste de imobilidade/mortalidade com o microcrustáceo também não indicou toxicidade em nenhum ponto coletado do Rio da Trincheira.

Figura 9 – Taxa de sobrevivência das *A. salina* dos grupos controle e tratados com as amostras de água do Rio Chopim, pelo ensaio de imobilidade/mortalidade



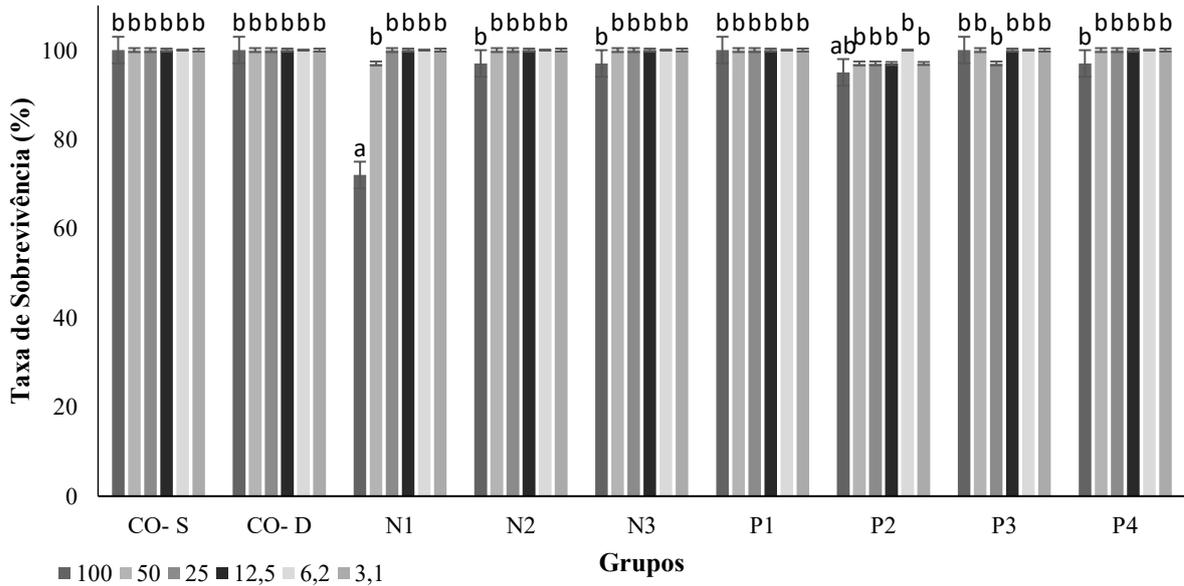
N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.
***Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).**
Fonte: Autoria própria (2024)

As amostras de sedimentos apresentaram resultados semelhantes aos das amostras de água, com exceção da concentração de 100% da N1. Para este ponto, nesta concentração, houve um número médio estatisticamente maior e significativo de organismos mortos/imóveis em comparação aos controles negativos, com taxa de sobrevivência próxima a 70% (Figura 10). Sabe-se que o grau de tolerância dos organismos é reduzido e específico em relação a fatores ambientais, de forma que eles apresentam uma resposta clara a pequenas variações na qualidade do ambiente (Abel, 1989). A análise de componentes principais (Figura 11-A) indica correlação positiva da taxa de mortalidade da *A. salina* com a concentração do metal manganês e o agroquímico Carbendazim.

Este resultado corrobora com o estudo de Dias et al. (2019) pois, avaliando as águas do parque tecnológico Vandeci Rack em Ji-Paraná, Rondônia, também

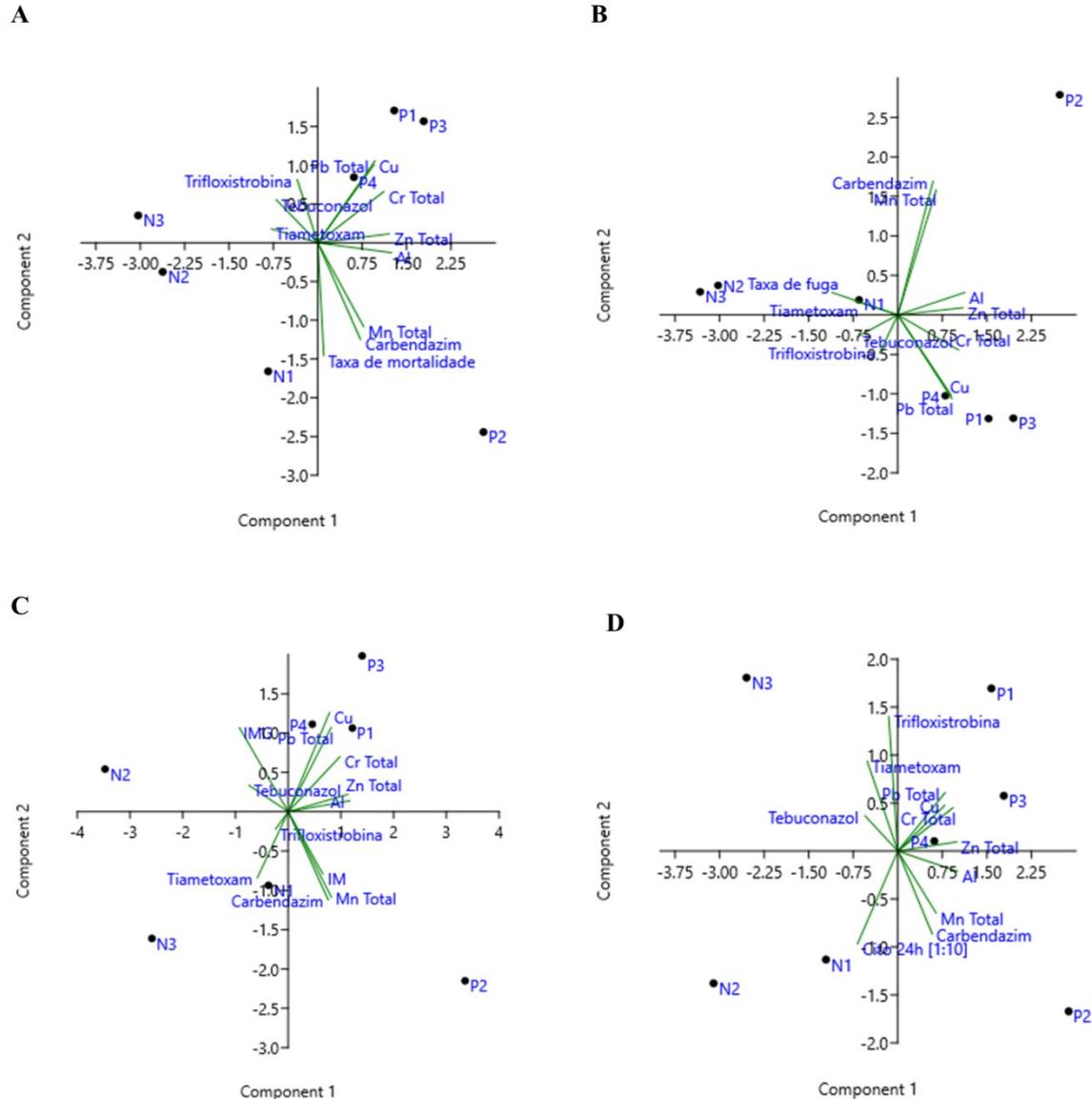
confirmaram toxicidade de uma nascente para *A. salina*, assim como, o manganês apresentava-se um pouco elevado.

Figura 10 – Taxa de sobrevivência das *A. salina* dos grupos controle e tratados com as amostras de sedimento do Rio Chopim, pelo ensaio de imobilidade/mortalidade



**N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).
 Fonte: Autoria própria (2024)**

Figura 11 – Análise de componentes principais (PCA) das amostras de sedimento do Rio Chopim



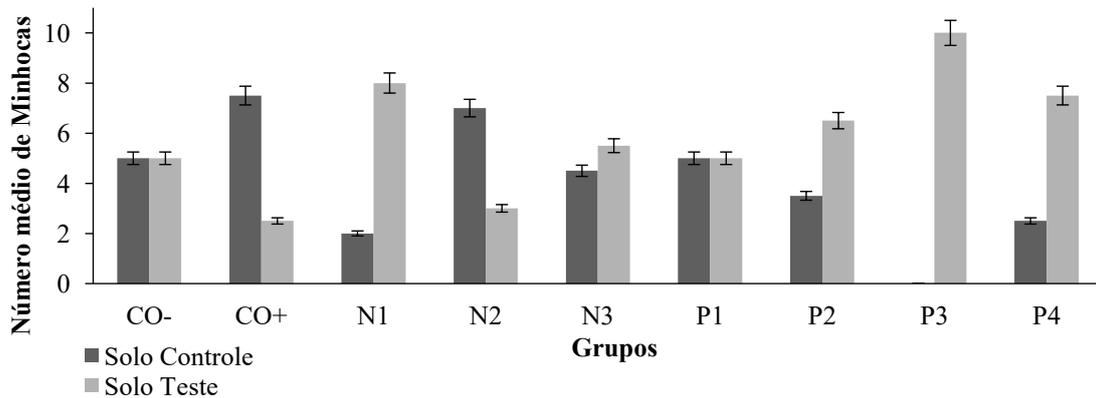
N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP. A: *Artemia salina*; B: *Eisenia fetida*; C: *Allium cepa* L.; D: Cultura celular; Al: Alumínio; Cu: Cobre; Cr Total: Cromo Total; Pb Total: Chumbo Total; Zn Total: Zinco Total; Mn Total: Manganês Total; IM: Índice Mitótico; IMG: Índice Mutagênico.
Fonte: Autoria própria (2024)

5.5.2 *Eisenia fetida*

O resultado da distribuição dos organismos *Eisenia fetida* nos grupos controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e das amostras de águas e sedimentos (N1, N2, N3, P1, P2, P3 e P4) estão representados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. É

possível observar que as minhocas se distribuíram de maneira satisfatória nos solos CO-, em uma proporção de 50% para cada lado nas amostras de águas e 40%-60% nas amostras de sedimentos. De acordo com a norma ISO 17512-1 (2011), a taxa de distribuição de minhocas no controle negativo deve estar compreendida entre 40% e 60%, sendo possível validar o teste.

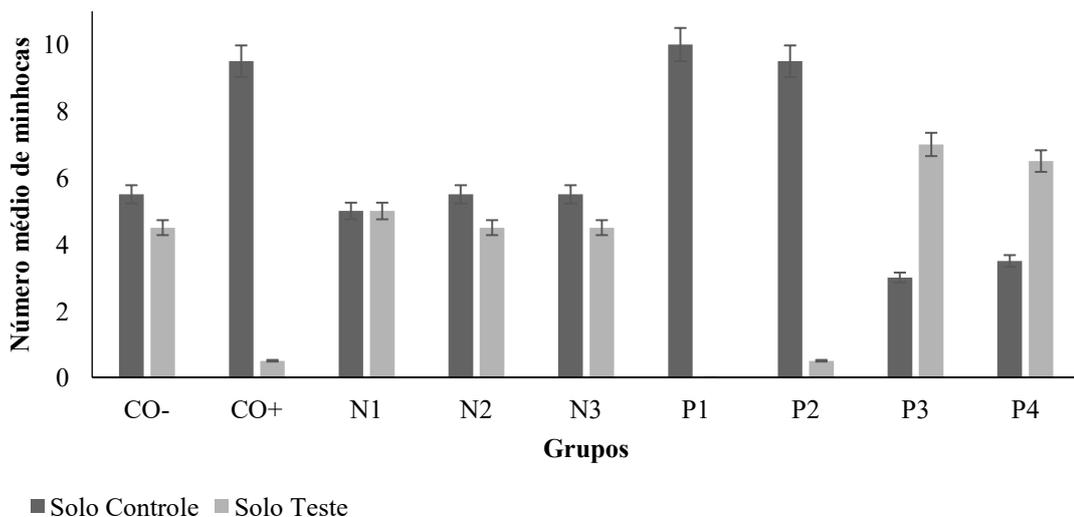
Figura 12 – Número médio e desvio-padrão das *E. fetida* distribuídas nos solos controle (CO- e CO+) e nas amostras de água dos diferentes pontos do Rio Chopim



CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 13 – Número médio e desvio-padrão das *E. fetida* distribuídas nos solos controle (CO- e CO+) e nas amostras de sedimentos dos diferentes pontos do Rio Chopim

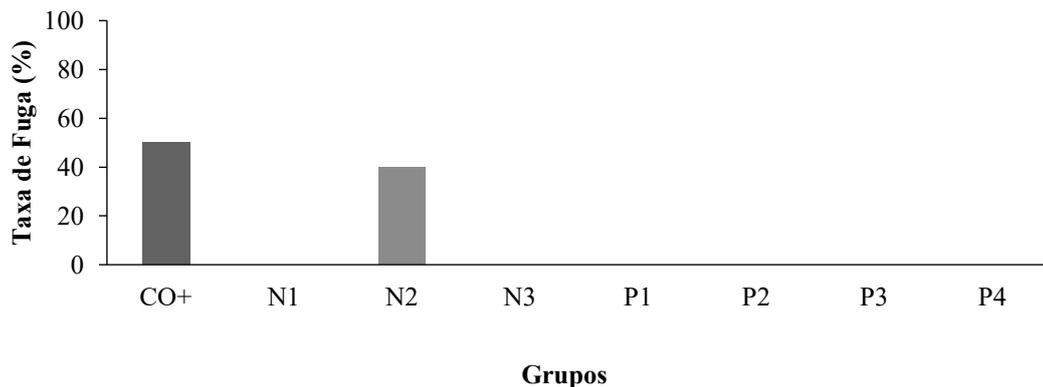


CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Fonte: Autoria própria (2024)

A porcentagem de fuga das minhocas expostas as amostras de água (Figura 14) indica que apenas o ponto N2 apresentou esse comportamento de fuga, expressando um evitamento de 40% dos organismos. Além disso, é possível constatar que para os demais pontos, além de não terem apresentado taxas de fuga, a maioria das minhocas apresentaram preferência pelo solo teste (Figura 12), sendo representado como taxa de fuga de 0%. Esses resultados corroboram com o apresentado por Schutz et al. (2021), os quais também analisaram amostras das águas do Rio Chopim, situado dentro do RVS-CP. No referido estudo, foram identificadas fugas negativas nos pontos P1, P2, P4 e P5, que correspondem aos mesmos locais analisados nesse trabalho, designados como N3, P1, P3 e P4, respectivamente.

Figura 14 – Taxa de fuga das *E. fetida* expostas as amostras de água do Rio Chopim



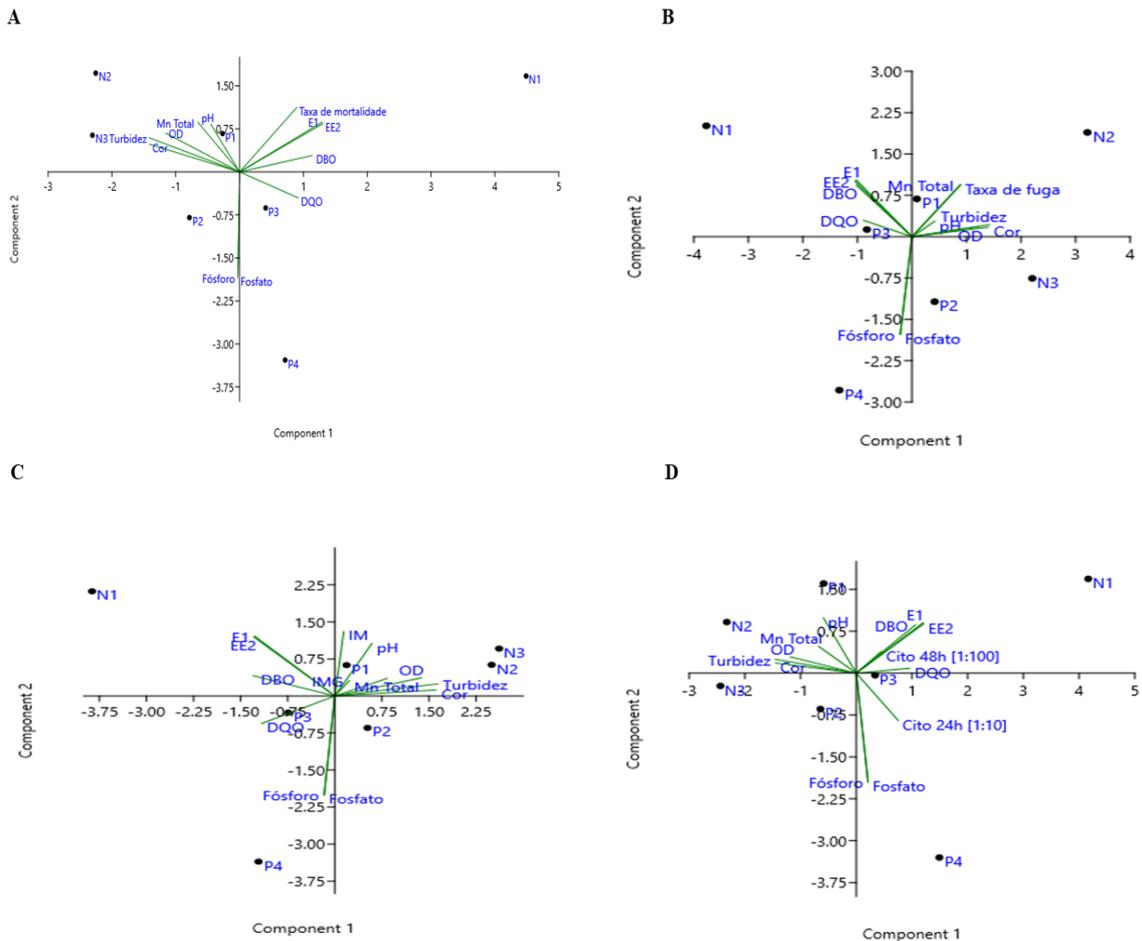
CO+: Controle positivo; **N1:** Nascente 1 do Rio Chopim; **N2:** Nascente 2 do Rio Chopim; **N3:** Nascente 3 do Rio Chopim; **P1:** Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P2:** Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P3:** Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P4:** Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Fonte: A autoria própria (2024)

A PCA (Figura 1-B5) indica correlação positiva do comportamento de fuga das minhocas com a concentração do metal manganês total e com os parâmetros turbidez, pH, OD e cor. Além disso, esse comportamento dos organismos nas águas do ponto N2 pode ser justificado pela presença do hormônio estrona (E1 – 0,021 mg/L) e, novamente, da concentração de manganês (0,1870 mg/L,) que apesar de estar dentro dos limites permitidos, é maior que os demais pontos do Rio Chopim (Tabela 5). Estes compostos isolados ou em combinação podem ter resultado em maior estresse para as minhocas e o efeito de fuga observado neste estudo.

Corroborar com o presente estudo o trabalho de Kuperman et al. (2004), em que o manganês foi tóxico para a mesma espécie de minhoca do presente estudo (*E. fetida*) em termos de produção de casulo. Reinecke e Reinecke (1996) também comprovaram que minhocas da espécie *E. fetida* expostas a manganês crescem mais lentamente, amadureceram mais tarde e produzem menos ou nenhum casulo.

Figura 15 – Análise de componentes principais (PCA) das amostras de água do Rio Chopim



N1: Nascente 1 do Rio Chopim; **N2:** Nascente 2 do Rio Chopim; **N3:** Nascente 3 do Rio Chopim; **P1:** Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P2:** Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P3:** Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P4:** Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP. **A:**

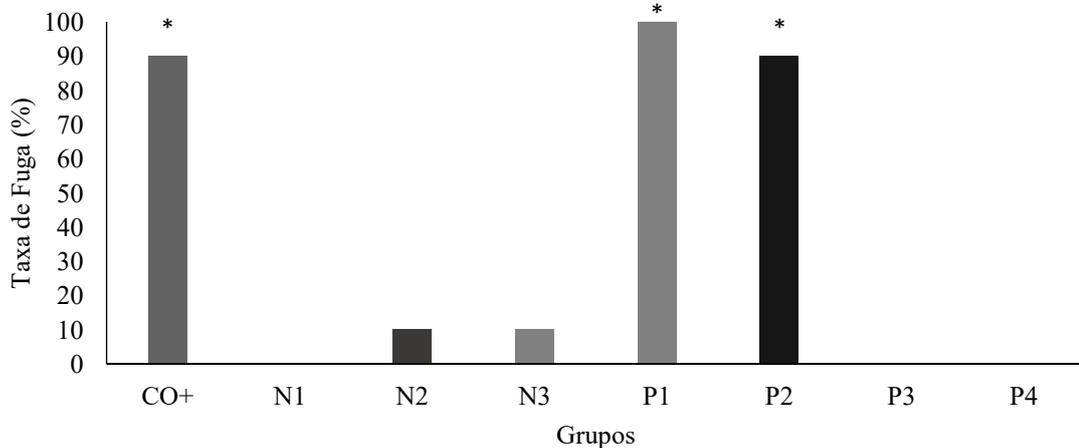
Artemia salina; **B:** *Eisenia fetida*; **C:** *Allium cepa* L.; **D:** Cultura celular; pH: Potencial Hidrogeniônico; OD: Oxigênio Dissolvido; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio; Mn Total: Manganês Total; E1: Hormônio Estrona; EE2: Hormônio 17 α -etinilestradiol; IM: Índice Mitótico; IMG: Índice Mutagênico.

Fonte: Autoria própria (2024)

Já para as amostras de sedimentos (Figura 16), as minhocas apresentaram taxas de fuga nos pontos N2, N3, P1 e P2. Os pontos das nascentes, N2 e N3, apresentaram uma taxa de fuga de somente 10%. Entretanto, o ponto P2 apresentou taxa de 90% e o ponto P1 de 100%, sendo diferentes estatisticamente

do controle negativo pela Prova Exata de Fischer. Estes pontos foram tóxicos de acordo com a ISO (2008), visto que o solo é considerado tóxico quando mais de 80% dos organismos expostos preferem o solo controle, ou seja, quando os organismos apresentam uma taxa de fuga acima de 60%. Acredita-se que a esquiva das minhocas aos pontos P1 e P2 possam estar relacionadas com as altas concentrações de metais, principalmente em P2, que apresentou as maiores concentrações de Al (56.729,533 mg/kg) e Mn (1.912,395 mg/kg), e a segunda maior concentração de Zn (51,84 mg/kg), o qual extrapola os limites permitidos pela legislação.

Figura 16 – Taxa de fuga das *E. fetida* expostas as amostras de sedimento do Rio Chopim



CO+: Controle positivo; **N1:** Nascente 1 do Rio Chopim; **N2:** Nascente 2 do Rio Chopim; **N3:** Nascente 3 do Rio Chopim; **P1:** Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P2:** Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P3:** Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; **P4:** Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

*Resultado estatisticamente significativo pela Prova exata de Fischer ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

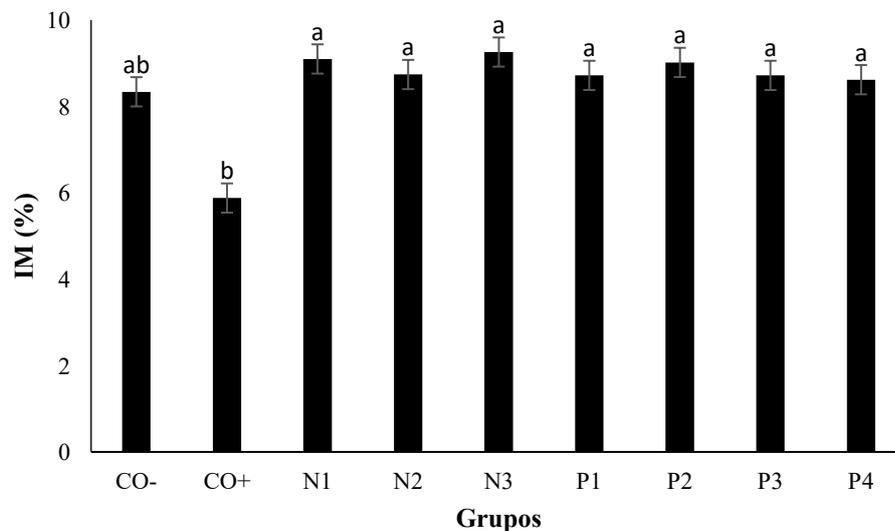
Ademais, a PCA apresentou correlação positiva com o agroquímico Tiametoxam e Trifloxistrobina (Figura 11-B), indicando que o comportamento de fuga possa também estar relacionado à sensibilidade do organismo a esses princípios ativos. Corrobora com essa informação o que foi apresentado no estudo de Feira et al. (2019), que comprovaram a taxa de fuga das minhocas expostas a efluentes contendo tiametoxam. Um estudo semelhante, conduzido por Teles et al. (2024), também comprovou comportamento de fuga das minhocas expostas a efluentes contendo tiametoxam. Somado a isso, ainda constataram toxicidade aguda pela mortalidade das minhocas.

Os resultados do presente estudo ainda corroboram também com os dados de Wu et al. (2021) que comprovaram que o fungicida trifloxistrobina pode induzir estresse oxidativo e danos ao DNA de minhocas da espécie *E. fetida*. Já Liu et al. (2020) mostraram que este fungicida e seu metabólico ácido trifloxistrobina alteram a via ribossômica e lisossômica das minhocas, afetando também a síntese e proteólise das mesmas.

5.5.3 *Allium cepa* L.

Os resultados do teste de citotoxicidade das células meristemáticas de *A. cepa* expostas às amostras de água e sedimento coletadas do Rio Chopim estão ilustrados nas Figuras 17 e 18, respectivamente. Ambos os testes não revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo para os índices mitóticos.

Figura 17 – Índices mitóticos (IM%) das *A. cepa* expostas as amostras de água do Rio Chopim



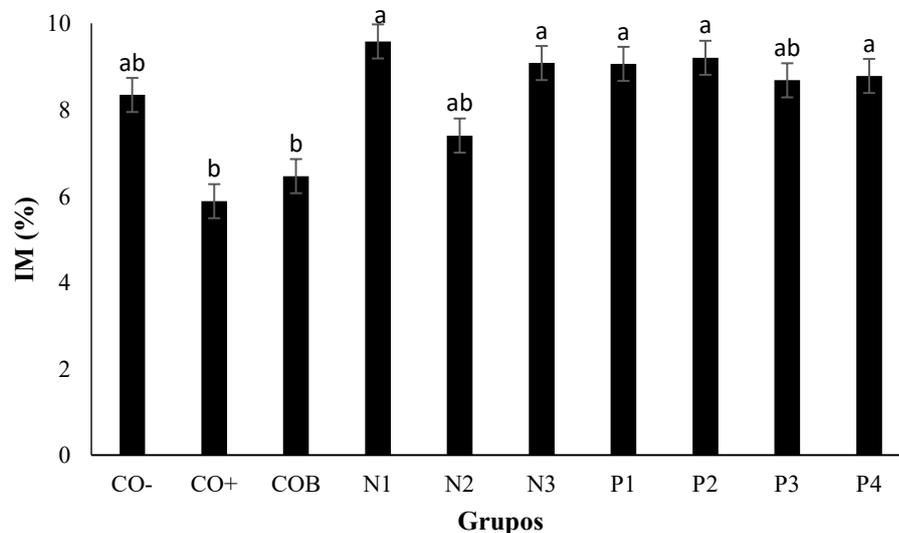
CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024).

Vale a ressalva que o índice mitótico (IM%) é um importante biomarcador utilizado em testes de biomonitoramento ambiental para avaliar o nível de citotoxicidade de compostos. Ele mede a proporção de células em divisão nas diversas fases do ciclo celular e serve como indicador de proliferação celular. Tanto

o aumento quanto a diminuição desse índice são indicativos de citotoxicidade: o aumento sugere desordem celular ao estimular a multiplicação das divisões celulares, enquanto a redução indica danos no DNA, levando à interrupção do ciclo celular na tentativa de reparo (Mercado e Caleño, 2020; Pavan et al., 2020). Assim, embora algumas amostras tenham demonstrado efeitos ecotoxicológicos em outros bioindicadores e parâmetros físico-químicos alterados, não houve impacto nessas células vegetais como bioindicador.

Figura 18 – Índices mitóticos (IM%) das *A. cepa* expostas as amostras de sedimento do Rio Chopim



CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; COB: Controle branco; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

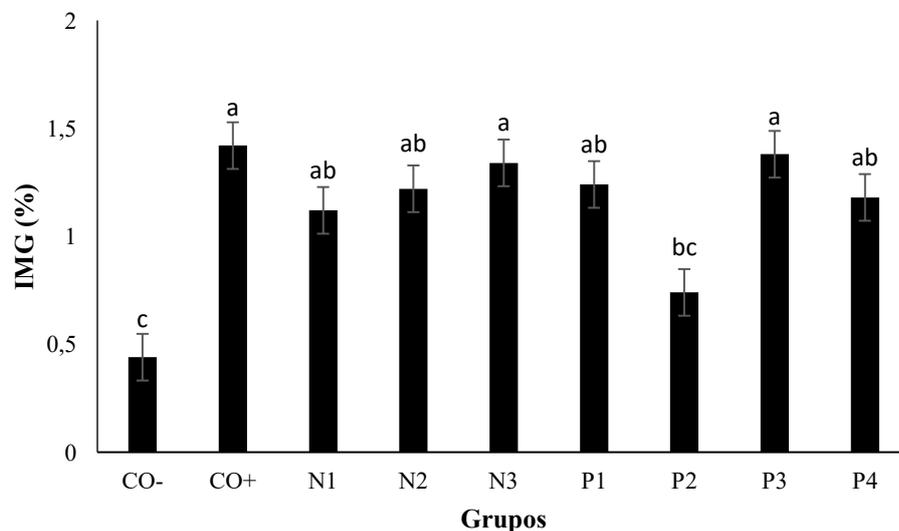
Em contrapartida, o índice mutagênico (IMG%) avalia o potencial genotóxico das amostras, analisando a presença de aberrações cromossômicas e a formação de micronúcleos nas células da ponta da raiz de *A. cepa*. No presente estudo observou-se que, para as amostras de água (Figura 19), apenas o P2 não apresentou efeito mutagênico para este bioindicador, enquanto que, para as amostras de sedimentos (Figura 20), todos os pontos analisados foram mutagênicos, com índices de mutagenicidade estatisticamente diferentes dos do controle negativo.

No estudo conduzido por Schutz et al. (2021), que investigaram o índice mutagênico das raízes de *A. cepa* expostas às amostras de água do Rio Chopim,

situado dentro do RVS-CP, somente o Ponto 4 (P3 neste trabalho) apresentou efeito mutagênico. Este ponto é especialmente relevante pois está próximo a uma área habitada, caracterizada por pastagens, campos nativos e mata ciliar, além de estar próximo aos limites do Refúgio. Essa proximidade pode estar sendo uma fonte potencial de poluição para toda a bacia do Rio Chopim, localizada dentro do RVS-CP, visto que esse ponto acaba contribuindo hidrológicamente com todos os demais pontos e nascentes analisados nesse estudo, como é possível ver na Figura 8.

A PCA das amostras de água (Figura 15-C) revelou correlação positiva do índice de mutagenicidade com os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e concentração de manganês. Semelhantemente, Oliveira, Voltolini e Barbério (2011), analisando as águas do rio Paraíba do Sul em Tremembé, São Paulo, também pelo teste com *A. cepa*, não identificaram efeito citotóxico das águas analisadas, entretanto, comprovaram efeito mutagênico das mesmas e concentrações acima dos limites da legislação de alumínio dissolvido, ferro dissolvido, fósforo total, manganês total, oxigênio dissolvido e *E. coli* termotolerante.

Figura 19 – Índices de mutagenicidade (IMG%) das *A. cepa* expostas as amostras de águas do Rio Chopim

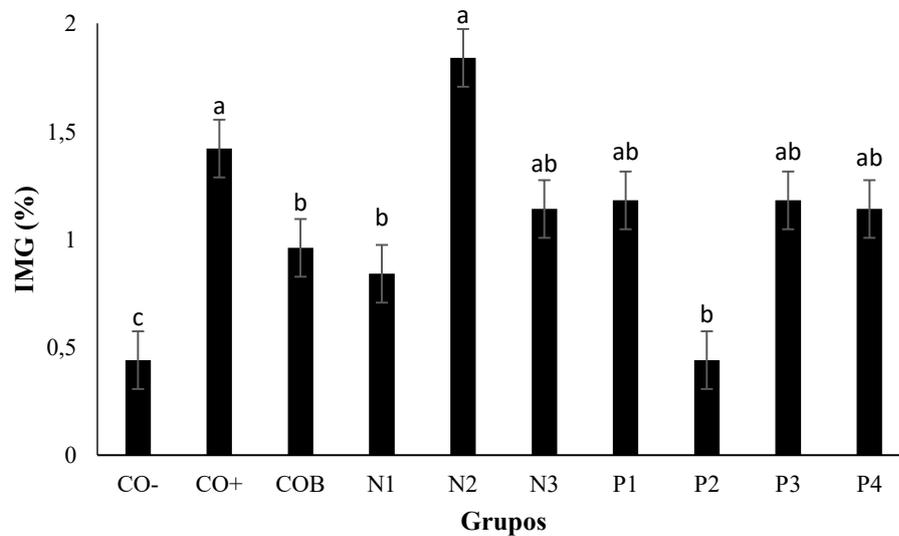


CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 20 – Índices de mutagenicidade (IMG%) das *A. cepa* expostas as amostras de sedimentos do Rio Chopim

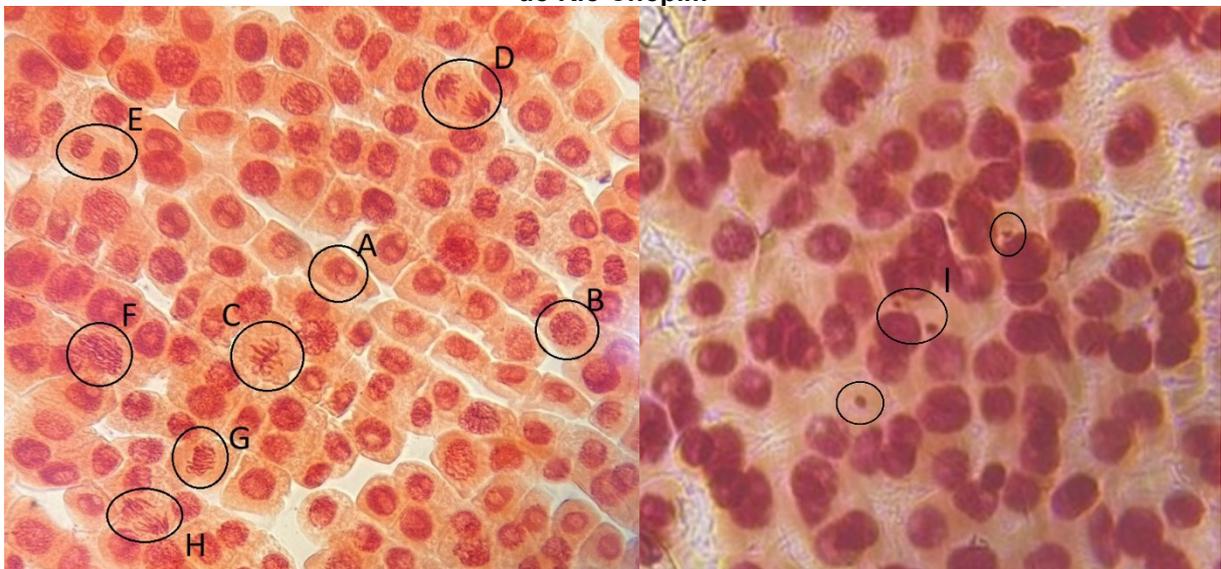


CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; COB: Controle branco; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 21 - Diferentes fases mitóticas de *A. cepa* expostas as amostras de água e sedimento do Rio Chopim



A: Interfase; B: Prófase; C: Metáfase; D: Anáfase; E: Telófase; F: Prófase com anomalia; G: Metáfase com anomalia; H: Anáfase com anomalia; I: Micronúcleo.

Fonte: Autoria própria (2024)

A PCA das amostras de sedimentos (Figura 11-C) mostrou correlação positiva do IMG% com o chumbo total e o fungicida Tebuconazol. Semelhantemente, Bernardes et al. (2015), Macar (2021) e Solano e Andrioli (2024) comprovaram a

genotoxicidade do fungicida Tebuconazol, pelo aumento os escores de micronúcleos, aberrações cromossômicas e nucleares de *A. cepa*. Com relação ao chumbo, os trabalhos de Arya, Basu e Mukherjee (2013) e Lerda (1992) mostraram que a exposição da *A. cepa* ao Pb causou aumento das aberrações cromossômicas, da fragmentação do DNA e da frequência de micronúcleos, assim como, aumento das enzimas oxidativas guaiacol peroxidase, catalase e do malonaldeído, um indicador de peroxidação lipídica.

Foram identificadas no presente estudo células com irregularidades em diferentes estágios da divisão celular, em todos os pontos de coleta de água e sedimento, conforme representado na Figura 21 e detalhado na Tabela 8. Na prófase, foram observadas anomalias, incluindo cromossomos isolados (Figura 21-F). Na fase da metáfase (Figura 21-G), constatou-se a ausência da formação da região equatorial, indicando uma organização inadequada dos cromossomos. Na anáfase, foram registradas formações de pontes (Figura 21-H), indicando uma separação incorreta das cromátides-irmãs. Além disso, observou-se uma considerável presença de micronúcleos (Figura 21-I), resultantes da fragmentação do cromossomo, o qual acaba formando um pequeno núcleo próximo ao núcleo original da célula.

Um comportamento semelhante foi observado no estudo conduzido por Sieklicki et al. (2019), no qual foi investigada a influência do uso e ocupação do solo urbano e periurbano na qualidade da água do Rio das Antas, localizado no município de Irati – PR. O estudo analisou os possíveis efeitos genotóxicos em três pontos de coleta, aplicando o teste de citotoxicidade e mutagenicidade com *Allium cepa*. Os resultados revelaram a presença de anormalidades cromossômicas em todas as fases da mitose nas células meristemáticas, indicando o potencial genotóxico das amostras em todos os pontos de coleta. Dentre as anormalidades cromossômicas observadas estavam pontes e aderências cromossômicas, cromossomos inconclusivos na placa equatorial da célula, fragmentos cromossômicos, aumento precoce de cromossomos ou cromossomos retardadores, resultando na formação de micronúcleos.

Tabela 8 – Tipos, números, total de alterações e índice de mutagenicidade (IMG%) obtidos para os grupos controle negativo (CO-), positivo (CO+) e branco (COB) e os grupos tratados com as amostras de águas e sedimentos do Rio Chopim

| Tratamento | PA | MA | AA | TA | MN | Total de alterações | IMG (%) |
|-------------------|----|----|----|----|----|---------------------|---------|
| CO- | 3 | 1 | 1 | 0 | 17 | 22 | 0,44c |
| CO+ | 18 | 3 | 1 | 0 | 49 | 71 | 1,42a |
| Águas | | | | | | | |
| N1 | 9 | 11 | 8 | 0 | 28 | 56 | 1,12ab |
| N2 | 8 | 5 | 1 | 0 | 47 | 61 | 1,22ab |
| N3 | 3 | 4 | 4 | 0 | 56 | 67 | 1,34a |
| P1 | 4 | 9 | 0 | 0 | 49 | 62 | 1,24ab |
| P2 | 2 | 5 | 1 | 0 | 29 | 37 | 0,74bc |
| P3 | 3 | 5 | 0 | 0 | 61 | 69 | 1,38a |
| P4 | 4 | 5 | 5 | 0 | 45 | 59 | 1,18ab |
| Sedimentos | | | | | | | |
| COB | 3 | 3 | 1 | 0 | 41 | 48 | 0,96b |
| N1 | 0 | 7 | 5 | 0 | 20 | 32 | 0,84b |
| N2 | 4 | 8 | 6 | 0 | 74 | 92 | 1,84a |
| N3 | 6 | 2 | 4 | 0 | 45 | 57 | 1,14ab |
| P1 | 2 | 6 | 1 | 0 | 50 | 59 | 1,18ab |
| P2 | 3 | 3 | 2 | 0 | 14 | 22 | 0,44b |
| P3 | 2 | 5 | 0 | 0 | 52 | 59 | 1,18ab |
| P4 | 4 | 7 | 5 | 0 | 41 | 57 | 1,14ab |

PA: Prófase com anomalia; MA: Metáfase com anomalia; AA: Anáfase com anomalia; TA: Telófase com anomalia; MN: Micronúcleo; IMG: Índice de mutagenicidade; CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; COB: Controle branco; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

A constatação de efeitos genotóxicos nessas amostras destaca a necessidade vital de monitorar essas substâncias químicas e seus impactos nos organismos vivos. As alterações observadas em nível molecular afetaram diretamente o material genético das amostras analisadas. As plantas possuem mecanismos de defesa que podem ser comprometidos quando expostas a situações de estresse ambiental, portanto, o uso excessivo e inadequado de defensivos, além de não garantir a eliminação das pragas, pode resultar no surgimento de doenças nas plantas (Pavan et al., 2020). Assim, a combinação dos compostos identificados nas amostras pode prejudicar as raízes, causando alterações radiculares e até mesmo a morte prematura das plantas.

5.5.4 Cultura

A viabilidade celular (VC) das células de fígado humano (HuH7.5) expostas as amostras de água e sedimento do Rio Chopim, estão representadas nas Figuras 22 e 23, respectivamente, e na Tabela 9.

Tabela 9 – Percentual de viabilidade de células (VC) HuH7.5 tratadas com as amostras de água e sedimento do Rio Chopim por 24 h, 48 h e 72 h, pelo teste do MTT

| Grupos | Água | | | Sedimento | | |
|-------------|--------|---------|--------|-----------|--------|--------|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| CO- | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| CO+ | 62,41* | 47,01* | 30,24* | 12,92* | 48,13* | 0,00* |
| N1 [1:10] | 101,51 | 97,61 | 103,24 | 225,21* | 77,26 | 81,30 |
| N1 [1:100] | 104,12 | 148,15* | 103,87 | 109,75 | 92,56 | 85,06 |
| N1 [1:1000] | 93,97 | 108,55 | 91,30 | 95,66 | 80,65 | 79,10 |
| N2 [1:10] | 94,97 | 94,80 | 91,13 | 301,69* | 84,29 | 103,06 |
| N2 [1:100] | 115,18 | 125,18 | 109,49 | 96,08 | 91,78 | 97,74 |
| N2 [1:1000] | 120,00 | 100,72 | 124,62 | 95,55 | 84,24 | 86,03 |
| N3 [1:10] | 92,86 | 111,18 | 112,53 | 84,32 | 88,24 | 85,81 |
| N3 [1:100] | 87,74 | 110,89 | 98,18 | 93,50 | 74,40 | 83,99 |
| N3 [1:1000] | 113,27 | 101,75 | 113,60 | 90,78 | 83,77 | 85,49 |
| P1 [1:10] | 79,20 | 109,93 | 88,81 | 81,04 | 73,83 | 83,23 |
| P1 [1:100] | 98,19 | 135,83 | 105,22 | 102,26 | 77,42 | 89,20 |
| P1 [1:1000] | 102,01 | 121,47 | 85,37 | 86,76 | 81,63 | 80,44 |
| P2 [1:10] | 89,25 | 112,12 | 90,06 | 77,65 | 69,04 | 76,95 |
| P2 [1:100] | 83,75 | 130,44 | 88,04 | 145,34 | 76,64 | 90,06 |
| P2 [1:1000] | 86,13 | 121,65 | 89,88 | 85,17 | 90,01 | 85,76 |
| P3 [1:10] | 89,52* | 130,26 | 98,30 | 130,93 | 75,86 | 73,72 |
| P3 [1:100] | 133,87 | 68,34 | 102,63 | 100,53 | 91,83 | 71,90 |
| P3 [1:1000] | 89,65 | 106,14 | 104,17 | 89,30 | 90,32 | 79,20 |
| P4 [1:10] | 102,24 | 89,00 | 105,93 | 130,19 | 80,19 | 70,39 |
| P4 [1:100] | 99,90 | 127,39 | 99,05 | 85,81 | 144,22 | 76,73 |
| P4 [1:1000] | 103,22 | 124,58 | 104,43 | 118,01 | 84,18 | 86,19 |

CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo pelo Teste de Dunnet ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

Para as amostras de água, a análise estatística mostrou que somente a concentração de 1:10 do P3, no tempo de 24 h, e a concentração de 1:100 da N1, no tempo de 48 h, apresentaram absorvâncias médias diferentes das do controle negativo (Figura 22). No caso do P3, a viabilidade celular foi reduzida para 89,52%, com indicativo de citotoxicidade. É relevante destacar que P3 apresentou valores de pH (5,98), oxigênio dissolvido (4,12 mgO₂/L), cor (124,96 mgPtCo/L), fosfato (0,11 mg/L) e demanda bioquímica de oxigênio (5,95 mgO₂/L) fora dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para a Classe 2 de águas doces (BRASIL, 2005). Inclusive, a PCA (Figura 15-D) expressou correlação positiva da absorvância média da concentração de 1:10 do tempo de 24 horas com o fósforo e o fosfato.

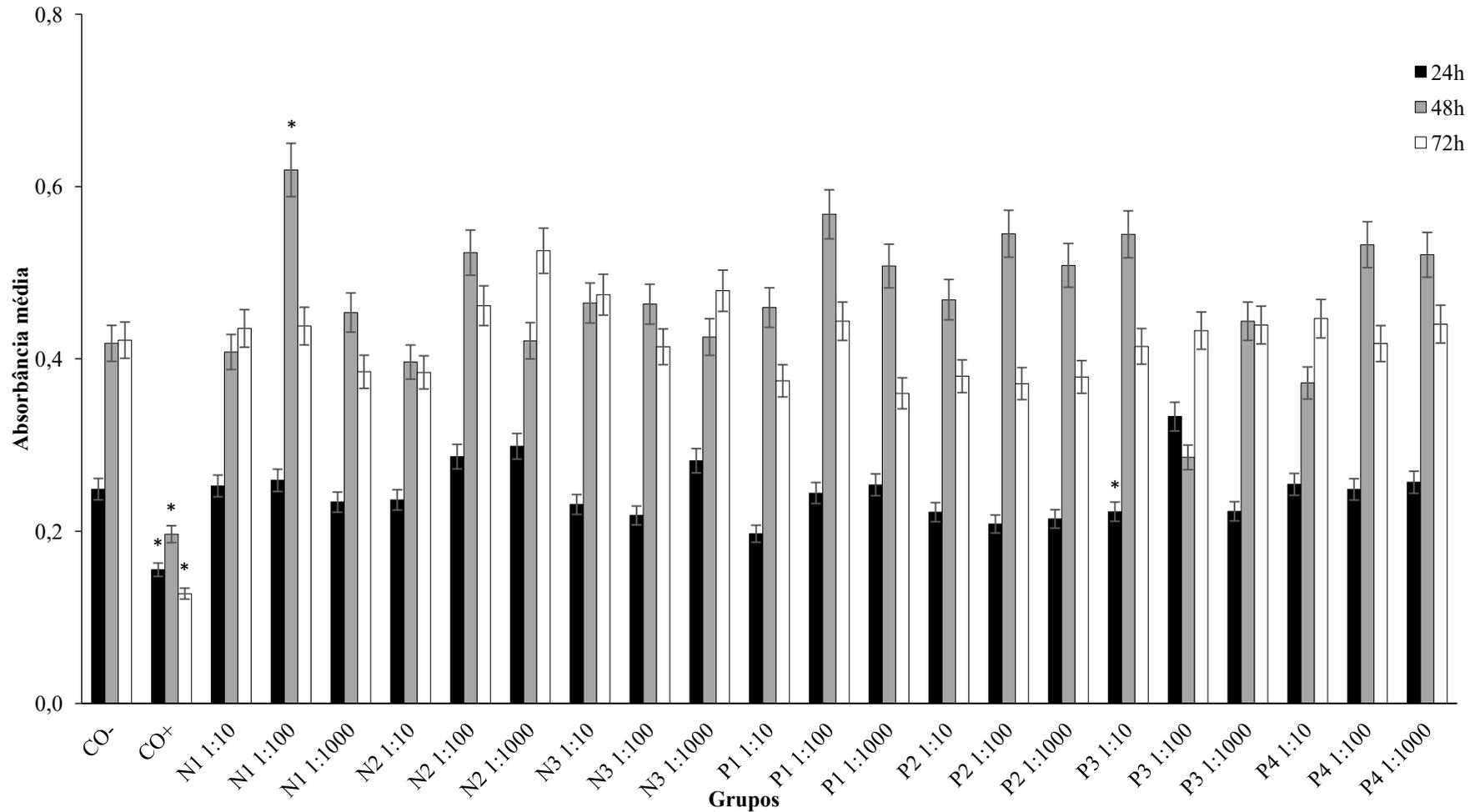
Trintinaglia et al. (2015), avaliando a citotoxicidade das águas do Rio Rolante pelo teste do MTT com cultura de células de fígado humano (HepG2), também identificaram efeito citotóxico de diferentes concentrações avaliadas. Os autores

justificam este efeito a baixa qualidade da água desta bacia, em especial devido a atividade agroindustrial. Neste caso, vale destacar que o P3 do presente estudo além possui contribuição hidrológica predominante de silvicultura, agricultura e pastagem.

No caso da N1, o padrão de resposta foi diferente, apresentando atividade proliferativa com aumento da viabilidade celular de 104,12% (24 h) para 148,15% (48 h), indicando potencial tóxico pelo estímulo das divisões celulares. Esse aumento momentâneo pode ter sido desencadeado pelo estresse provocado pela presença dos hormônios estrona (E1 – 0,805 mg/L) e etinilestradiol (EE2 – 0,099 mg/L), e pelos parâmetros de oxigênio dissolvido (4,25 mgO₂/L) e demanda bioquímica de oxigênio (6,59 mgO₂/L), visto que ambos estão fora dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005. Inclusive a PCA (Figura 11-D) indicou correlação positiva das absorvâncias médias da concentração de 1:100 do tempo de 48 horas com a DBO e DQO e com os hormônios E1 e EE2 (Figura 11-D). Por se tratar de células humanas, é possível que a presença destes hormônios estrógenos (E1 e EE2) tenham promovido o crescimento celular por estimular a liberação de fatores de crescimento tumorais e semelhante à insulina e pela inibição de fatores de crescimento tumorais, como observado por Norman e Litwack (1997). Nunes (2015) também verificou que o 17 β -estradiol induziu aumento do crescimento, da proliferação e da viabilidade celular mamária humana.

Com relação às células HuH7.5 tratadas com diferentes concentrações das amostras de sedimentos do Rio Chopim, observou-se que a concentração de 1:10 das amostras das nascentes 1 e 2 apresentou absorvâncias médias estatisticamente maiores e diferentes do controle negativo, após 24 h (Figura 23). As viabilidades celulares foram de 225,21% para N1 e 301,69% para N2. Como mencionado anteriormente, esse aumento na proliferação celular pode ser atribuído ao estresse causado pela exposição dessas células aos poluentes, visto que as amostras de sedimentos das nascentes demonstraram um teor elevado de zinco (N1 e N2), ultrapassando os limites estabelecidos pela legislação do CONAMA nº 454/2012 (BRASIL, 2012), além da detecção do pesticida Tebuconazol (N2) e elevada presença de alumínio (N1).

Figura 22 – Absorbâncias médias de células HuH7.5 tratadas com as amostras de águas do Rio Chopim, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

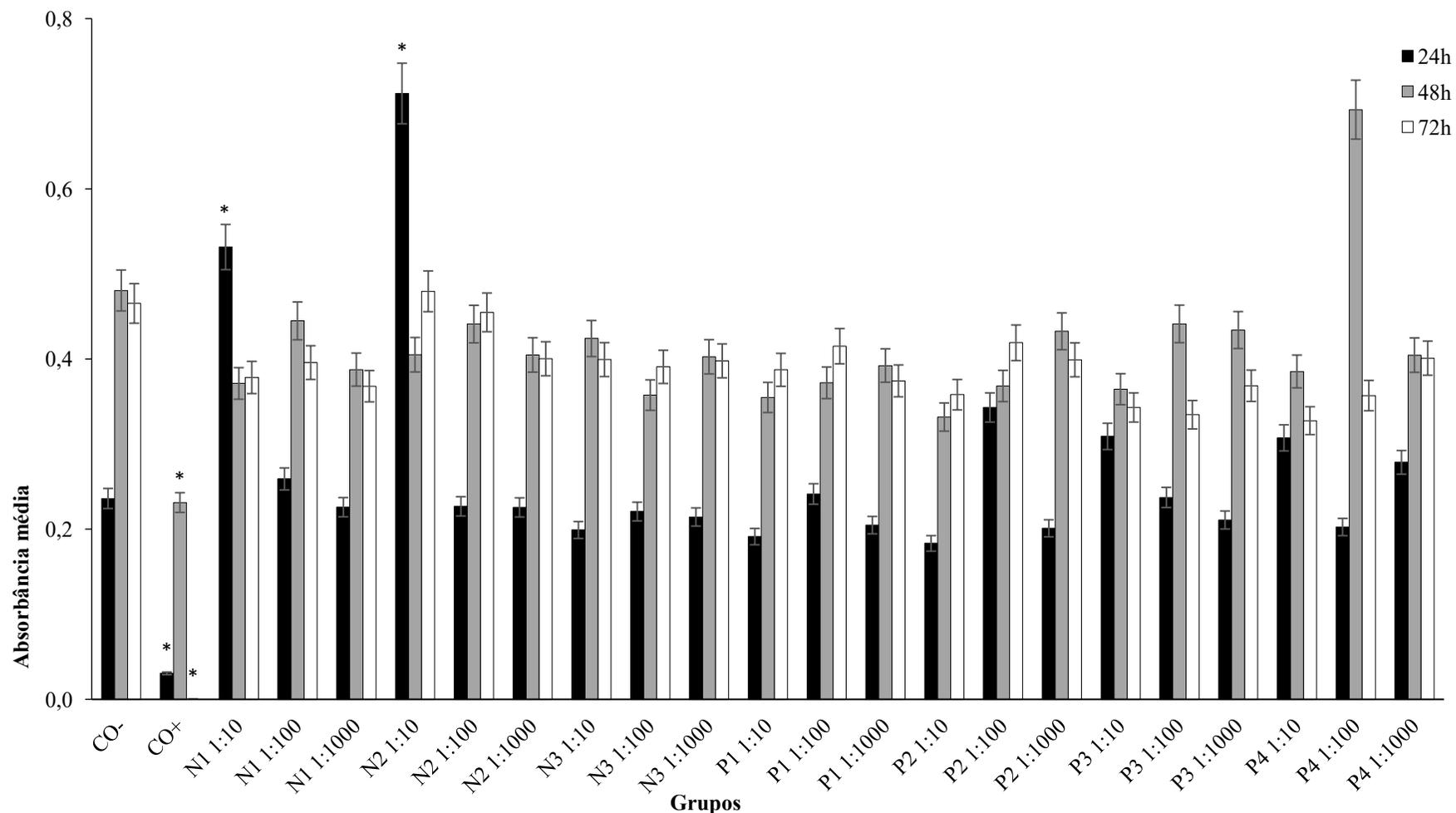


CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 23 – Absorbâncias médias de células HuH7.5 tratadas com as amostras de sedimentos do Rio Chopim, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do



MTT

CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo; N1: Nascente 1 do Rio Chopim; N2: Nascente 2 do Rio Chopim; N3: Nascente 3 do Rio Chopim; P1: Ponto 1 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P2: Ponto 2 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P3: Ponto 3 do Rio Chopim dentro do RVS-CP; P4: Ponto 4 do Rio Chopim fora do RVS-CP.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2024)

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo destacam a importância e relevância do biomonitoramento das águas e dos sedimentos do Rio Chopim, dentro da unidade de conservação Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas e no seu entorno, principalmente pelos efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos observados.

Os dados apresentados no trabalho identificaram que todas as amostras de água coletadas apresentaram ao menos um parâmetro físico-químico alterado, ou seja, fora dos limites estabelecidos pela Resolução do CONAMA nº 357/2005. Com exceção dos parâmetros turbidez, fósforo e nitrogênio, os demais parâmetros analisados (pH, oxigênio dissolvido, cor, fosfato e demanda bioquímica de oxigênio) apresentaram valores que não se adequaram à Resolução.

Quanto a concentração dos metais presentes nas amostras de águas, somente o cobre, em todos os pontos de coleta, e o manganês na N2 apresentaram concentrações fora dos limites estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005. Diferente para as amostras de sedimentos, as quais apresentaram, em todos os pontos, concentrações de zinco acima do permitido pela legislação do CONAMA nº 454/2012. E, apesar do alumínio não estar quantificado na Resolução, é o metal que apresenta as concentrações mais elevadas quando comparado com os demais. Na quantificação de hormônios, apenas os hormônios estrona (E1), nas nascentes 1 e 2, e etinilestradiol (EE2), na nascente 1, foram detectados.

Com relação a ecotoxicidade, todos os bioindicadores utilizados apresentaram comportamento que indicam toxicidade em pelo menos um ponto. Os resultados do teste de imobilidade/mortalidade utilizando o microcrustáceo *A. salina* mostram que todas as amostras de água, nas diferentes concentrações avaliadas, não apresentaram efeito tóxico ao organismo teste, com taxas de sobrevivência próximas a 100%. Similarmente para as amostras de sedimentos, as apresentaram resultados semelhantes aos das amostras de água, com exceção da concentração de 100% da N1.

O bioindicador vegetal (*A. cepa*) apresentou níveis de mutagenicidade em todos os pontos para as amostras de sedimentos, assim como para as amostras de água, com exceção do P2. Ao contrário disso, o índice mitótico não apresentou comportamento citotóxico em nenhuma das amostras de água e sedimento.

Já as minhocas (*E. fetida*) apresentaram um comportamento de toxicidade menor, visto que para as amostras de água presenciou-se a fuga apenas na N2, enquanto que para as amostras de sedimento, nas nascentes 2 e 3 e nos pontos 1 e 2. Por fim, a cultura de célula humana (Huh7.5) apresentou níveis de citotoxicidade nas amostras de águas na N1 e no P3, e nas amostras de sedimentos, nas nascentes 1 e 2.

Desta forma, ressalta-se a necessidade da implementação de ações mais efetivas de conservação ambiental nessa UC de Proteção Integral. Além disso, um destaque para as nascentes, principalmente as N2 e N3, que apresentaram efeitos citotóxicos e mutagênicos em praticamente todos os bioindicadores, as quais apontam necessidade de maiores cuidados e proteção, visto que são nascentes e afetam diretamente na qualidade das águas do Rio Chopim.

Com isso, os resultados mostraram que a combinação de bioindicadores junto com as análises físicas, químicas, de metais, agroquímicos e hormônios são importantes para potencializar a visibilidade dos impactos dos diferentes usos e ocupações de solo nesta UC, tanto nas águas quanto nos sedimentos. Além disso, destacam a relevância do monitoramento periódico e diversificado dentro de UCs, em especial, as de Proteção Integral como o RVS-CP.

A preservação ambiental das unidades de conservação, em especial o Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas, transcende a mera manutenção de uma área de beleza cênica singular, que abriga fragmentos da Mata Atlântica e representa um dos biomas mais ameaçados do país. É crucial controlar as atividades e conservar os recursos naturais na bacia hidrográfica do Rio Chopim, desde sua nascente, para garantir o desenvolvimento da biodiversidade e a qualidade da água. Esta última está diretamente ligada à saúde da população que dela depende para consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abatzopoulos, T; Beardmore, JA; Clegg, JS; Sorgeloos, P. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Springer Dordrecht, 1st ed., 286 p., 2002. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0791-6>.

Abel, PD. *Water Pollution Biology*. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.

Aguillar, CN; Soares, LQ; Mendes, FQ; Carvalho, AMX; Nasser, VG. Avaliação do teor de metais pesados na água de Rio Paranaíba - MG. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p. 64781-64880, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-064>.

Albinati, ACL; Albinati, RCB; Lira, AD; Soares, PC. Toxicidade aguda e risco toxicológico do inseticida tiametoxam para alevinos de tilápia-do-nylo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 5, p. 1343-1350, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8676>.

Almeida, TP; Macena, DA; Simões, JST; Mareco, EA; Rossi, RC; Favareto, APA. Análise de parâmetros de qualidade da água e teste de genotoxicidade em peixes da bacia hidrográfica do rio Pirapozinho –SP, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, e46711319309, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.19309>.

Álvarez-Alarcón, N; Osório-Méndez, JJ; Ayala-Fajardo, A; Garzón-Méndez, WF; Garavito-Aguilar, ZV. Zebrafish and *Artemia salina* in vivo evaluation of the recreational 25C-NBOMe drug demonstrates its high toxicity. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 315-323, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.01.010>.

Álvarez-Malvido, M; Lázaro, C; De Lamo, X; Juffe-Bignoli, D; Cao, R; Bueno, P; Sofrony, C; Maretti, C; Guerra, F. **Informe Planeta Protegido 2020: Latinoamérica y el Caribe**. Ciudad de México, México; Cambridge UK; Gland, Switzerland; Bogotá, Colombia: RedParques, UNEP-WCMC, CMAP-UICN, WWF, CONANP y Proyecto IAPA, p. 148, 2021.

Alves, EC; Silva, CF; Cossich, ES; Tavares, CRG; Souza Filho, EE; Carniel, A. Water quality evaluation of the Pirapó river basin – Maringá, Paraná State, through physical, chemical and microbiologic parameters. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 39-48, 2008. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v30i1.3199>.

Alves, RIS; Tonani, KAA; Nikaido, M; Cardoso, OO, Trevilato, TMB; Segura-Muñoz, SI. Avaliação das concentrações de metais pesados em águas superficiais e sedimentos do Córrego Monte Alegre e efluentes, Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Ambiente & Água**, v. 5, n.3, p. 122–132, 2010. <https://doi.org/10.4136/ambiente-agua.157>.

ANA - Agência Nacional de Águas. UNIDADE 3: Variáveis e parâmetros de qualidade de água em rios e reservatórios. In: ANA - Agência Nacional de Águas. **Monitoramento da qualidade da água em rios e reservatórios**. Brasília: Agência Nacional das Águas, 2020. Disponível em:

<<https://capacitacao.ana.gov.br/conhecerh/handle/ana/2227>>. Acesso em 08 de fev. 2023.

Andrade, MCK; Ferreira, RL; Souza, SML. Determinação de contaminantes emergentes no Rio Barigui - Curitiba/Paraná. **Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 9, n. 16, 2020.

Andréa, MM. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana** (online), Número Especial 2: p. 95-107, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372010000500007&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 15 de mar. 2023.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) AND WEF (Water Environment Federation). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: American Public Health Association, 1998.

APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Washington: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, 2012.

APHA; AWWA; WEF. Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group: standard total coliform fermentation technique. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2017. Part 9221B. Approved by Standard Methods Committee, 2014a. Disponível em: <http://www.standardmethods.org/store>. Acesso em: 17 de mar. 2023.

APHA; AWWA; WEF. Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group: estimation of bacterial density. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater: online**. Washington, DC, c2017. Part 9221C. Approved by Standard Methods Committee, 2014b. Disponível em: <http://www.standardmethods.org/store>. Acesso em: 17 de mar. 2023.

Apremavi. **Gestão participativa em Unidades de Conservação: uma experiência na Mata Atlântica**. 1ª Ed. - Rio do Sul, Sc. 2012.

Arias, ARL; Buss, DF; Albuquerque, C; Inácio, AF; Freire, MM; Egler, M; Mugnai, R; Baptista, DF. Utilização de Bioindicadores na avaliação de impacto no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100011>.

Armas, ED; Monteiro, RTR; Antunes, PM; Santos, MAPF; Camargo, PB; Abakerli, RB. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500013>.

Arya, SK; Basu, A; Mukherjee, A. Lead induced genotoxicity and cytotoxicity in root cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Nucleus**, 56, 183–189. 2013. <https://doi.org/10.1007/s13237-013-0099-z>.

Assis, PC; de Faria, KMS; Bayer, M. Unidades de Conservação e sua efetividade na proteção dos recursos hídricos na Bacia do Rio Araguaia. **Sociedade & Natureza**, v. 34, e60335, 2022. <http://doi.org/10.14393/SN-v34-2022-60335>.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 10006**: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro. 2004.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15537**: Ecotoxicologia terrestre. Ecotoxicologia aguda. Método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro, 2007

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 13373**: Ensaio de toxicidade com microcrustáceos. Rio de Janeiro. 2010.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 17512-1**: Qualidade do Solo — Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro. 2011.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 9001:2008**: Sistemas de gestão da qualidade – Requisitos. Rio de Janeiro, 2008.

Ates, M; Daniels, J; Arslan, Z; Farab, IO. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2794-7>.

Bagatini, MD; Silva, ACF; Tedesco, SB. Uos do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300019>.

Barros, AB; Azevedo, JAM; Bastos, AL; Nascimento, VX. Caracterização e biodisponibilidade de metais no mangue da Foz do Rio Meirim, Maceió - AL. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 20133-20147, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-586>.

Batista, FGA; Freire JA. Avaliação de metais pesados no corpo aquático do Açude Velho: Campina Grande-Paraíba. **Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, n. 4, 2010. p. 166-179, 2010.

Belhaj, D; Bacchar, R; Jaabiri, I; Bouzid, J; Kallel, M; Ayadi, H; Zhou, JL. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 154-160, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.018>.

Belingheri, M; Chiu, YHM; Renzetti, S; Bhasin, D; Wen, C; Placidi, D; Oppini, M; Covolo, L; Padovani, A; Lucchini, RG. Relationships of Nutritional Factors and Agrochemical Exposure with Parkinson's Disease in the Province of Brescia, Italy. **Int J Environ Res Public Health**, v. 19, n. 6. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijerph19063309>.

Benson, NU; Adedapo, AE; Fred-Ahmadu, OH; Williams, AB; Udosen, ED; Ayejuyo, OO; Olajire, AA. New ecological risk indices for evaluating heavy metals contamination in aquatic sediment: a case study of the Gulf of Guinea. **Regional Studies in Marine Science**, v.18, p.44–56, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2018.01.004>.

Bernardes, PM; Andrade-Vieira, LF; Aragão, FB; Ferreira, A; Ferreira, MFS. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water Air Soil Pollut**, 226, 207. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2462-y>.

Bezerra, JM; Batista, RO; Silva, PCM. Caracterização do processo de poluição dos sedimentos do rio Apodi-Mossoró no trecho urbano de Mossoró-RN. **Soc. Nat.**, v.30, n.3, p.108-126, 2018. <https://doi.org/10.14393/SN-v30n3-2018-6>.

Braga, JRM; Lopes, DM. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Rev. Ambient. Água**, v. 10, n.1. 2015. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1459>.

Brasil. Câmara dos Deputados. **Projeto de Lei nº 4521, de 11 de setembro de 2020**. Dispõe sobre o controle da concentração de estrogênio nos efluentes das estações de tratamento de esgoto e na água de abastecimento público. Brasília: Câmara dos Deputados, 2020. Disponível em: <<https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=2262801>>. Acessado em: 21 de ago. de 2023.

Brasil. **Decreto Legislativo nº 2/1994**. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decleg/1994/decretolegislativo-2-3-fevereiro-1994-358280-publicacaooriginal-1-pl.html>>. Acesso em: 15 de mai. 2023.

Brasil. **Decreto Legislativo nº 7.802/1989**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 de julho de 1989. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/616627.pdf>>. Acesso em: 09 de fev. 2023.

Brasil. ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Plano de Manejo Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas**. Ministério do Meio Ambiente. p. 196. 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**. Fundação Nacional de Saúde, 4ª ed. Brasília: Funasa, 2013. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf>. Acesso em: 08 de fev. 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 211 p. 2006. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf>. Acesso em: 08 de fev. 2023.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. **Programa Nacional do Meio Ambiente II – PNMA II**, Fase 2, 2009 – 2014. p. 4.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 03 de fev. 2023.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 454, de 1º de novembro de 2012**. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2012/res_conama_454_2012_materia_ser_dragado_em_aguas_jurisdicionais_brasileiras.pdf>. Acesso em: 15 de fev. 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza: Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000; Decreto nº 4.340, de 22 de agosto de 2002; Decreto nº 5.746, de 5 de abril de 2006**. Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas: Decreto nº 5.758, de 13 de abril de 2006. Brasília: MMA, 2011. 76 p.

Brasil. Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. **Lei n.º 9.985, de 18 de julho de 2000**. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.html>. Acesso em: 15 de mai. 2023.

Bressiani, PA; Alves, GL; De Marco, IG; Biffi, MT; Ishikawa, S; Manosso, FC; Gomes, EMV; Porkywiecki, TS; Schmitz, APO; Düsman, E. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of inhabitants of Vila Rural Água Viva, Brazil, exposed to agrochemicals using the micronucleus buccal cytome assay. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 104002, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.104002>

Cairns, JJ; Pratt, JR. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: Rosenberg DM, Resh VH. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall; p. 10-27, 1993.

Caldas, SS; Gonçalves, FF; Primel, EG; Prestes, OD; Martins, ML; Zanella, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e

por espectrometria de massas. **Química Nova**, v.34, n.9, p.1604-1617, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>.

Calisi, A; Lionetto, MG; Schettino, T. Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1369-1377, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.010>.

Carr, GM; Neary, JP. **Water Quality for Ecosystem and Human Health**. United Nations Development Programme, Global Environment Monitoring System/Water Programme: New York, NY, USA, 2008.

Catojo, AMZ; de Jesus, SC. As Unidades de Conservação do Estado de São Paulo - Planos de Manejo e Representatividade. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 15, n. 6, p. 2921-2946, 2022. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v15.6.p2921-2943>.

Ciapetti, G; Granchi, D; Verri, E; Savarino, L; Cavedagna, D; Pizzoferrato, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, n. 13, p. 1259-1264, 1996.

Coelho, HA; Rezende, EN. A efetiva implantação das unidades de conversação ambiental por meio da desapropriação. **Revista do Direito Público**, v. 11, n. 2, p. 165-195, 2016. <http://dx.doi.org/10.26668/IndexLawJournals/2358-1352/2015.v11i5.2903>.

Costa, CR; Olivi, P; Botta, CMR; Espindola, ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.

Costa, DG; Campos, TMP; Cesar, RG; Castilhos, ZC; Rocha, BCRC. Ecotoxicidade do 2,4-D a oligoquetas em função do tipo de solo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 14, n. 3, p.248-255, 2015. <https://doi.org/10.7824/rbh.v14i3.423>.

Cruz, AS. **Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de draize na avaliação de produtos cosméticos**. 2003. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo.

Cruzeiro, C; Amaral, S; Rocha, E; Rocha, MJ. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 126–13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.010>.

Dezzoti, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos. **Processos Escola Piloto de Engenharia Química COPPE/UFRJ**, v. 5, Rio de Janeiro: **Editora E-papers**, 2008.

Dias, EC; Ferrari, ALS; Schmidt, RB; Silva, F; Salvi, JOS; Salvi, JS. Qualidade físico-química, microbiológica e a toxicidade de corpos hídricos do Parque Tecnológico Vandeci Rack em Ji-Paraná, Rondônia. **SAJEBTT**, Rio Branco, UFAC, v. 6, n. 1, p. 282-296. 2019. <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/2176/1547>.

Dudley, N. Stolton, S, Shadie, P. Guidelines for Applying Protected Area Management Categories Including IUCN WCPA Best Practice Guidance on Recognising Protected Areas and Assigning Management Categories and Governance Types. **IUCN**. 2013

El-Shahaby, OA; Abdel-Migid, HM; Soliman, MI; Mashaly, IA. Genotoxicity Screening of Industrial Wasterwater Using the *Allium Cepa* Chromosome Aberration Assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Baltimore, v. 6, n. 1, p. 23-28, 2003. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.23.28>.

Esteves, FA. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: FINEP/Interciência. 1988. 575 p.

Fan, FM; Mesquita, MO; Santos, VCFD; Lucas, EO; Zanella, R; Prestes, OD; Bandeira, NMG. Resíduos de agrotóxicos em água e solo de município em região produtora de fumo no Rio Grande do Sul. **Saúde coletiva, desenvolvimento e (in)sustentabilidades no rural**. p. 89-108, 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/183123>>. Acesso em: 09 de fev. 2023.

Ferreira, CF; Frueh, AB; Düsman, E; Heck, MC; Vicentini, VEP. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia – PR) e Tabatinga (Mandaguari – PR) em *Allium cepa* L. **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 46-54, 2012. Recuperado de <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/1121>

Fieira, C; Batistella, EP; Vincoski, JVA; Rosa, MPS; Pokrywiecki, JC; Gomes, EMV; de Oliveira, AP; Pokrywiecki, TS; Düsman, E. Treatment of effluent containing thiamethoxam and efficiency evaluation of toxicity reduction. **Environmental Technology**, 42(16), 2489–2503, 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1703827>.

Filizola, HF; Gomes, MAF; Souza, MD. Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 169 p., 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/129660/1/2006OL-008.pdf>>. Acesso em: 15 de mai. 2023.

Fiskesjö, G. The *Allium test* as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>.

Fiskesjö, G; Levan, A. Evaluation of the Firstten MeIC Chemicals in the *Allium cepa*. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, n. 2, p. 139–149, 1993. <https://doi.org/10.1177/026119299302100204>.

Fochzato, IC. PRF apreende na região agrotóxicos de uso proibido no Brasil. **Grupo RBJ**, Francisco Beltrão, 19 de janeiro de 2023. Disponível em: <<https://rbj.com.br/prf-apreende-na-regiao-agrotoxicos-de-uso-proibido-no-brasil/>>. Acesso em 19 de ago. de 2023.

Fonseca, M; Lamas, I; Kasecker, T. O Papel das Unidades de Conservação. **Scientific American Brasil Especial**, v. 39, p. 18–23, 2010.

Fotakis, G; Timbrell, JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>.

Fragoso, C; Lavelle, P; Blanchart, E; Senapati, BK; Jiménez, JJ; Martínez, MA; Decaëns, T; Tondoh, J. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. **Earthworm management in tropical agroecosystems**, CABI, Wallingford, p. 27-55, 1999. Disponível em: < <https://core.ac.uk/download/pdf/39848563.pdf>>. Acesso em 15 de mar. 2023.

França, JS; Callisto, M. **Monitoramento participativo de rios urbanos por estudantes-cientistas**. 1. ed. Belo Horizonte, 284 p., 2019. <http://doi.org/10.17648/ufmg-monitoramento2019>.

Freddi, LA; Américo-Pinheiro, JHP. Ecotoxicidade de efluentes para organismos aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 10, n. 20, 2017. <https://doi.org/10.17271/19843240102020171663>.

Gabardo, RP. **Estudo para determinação de herbicida 2,4-D em água através de CLAE-DAD**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba.

Gadano, A; Gurni, A; López, P; Ferraro, G; Carballo, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal Ethnopharmacol**, v. 81, n. 1, p. 11-16, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00418-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00418-4).

Galvão, JR; Tedesco, CD. Contribuições da percepção ambiental para a sustentabilidade na zona de amortecimento de unidade de conservação. **Ambiente & Sociedade**, v. 25, e02625, 2022. <https://doi.org/10.1590/1809-4422asoc20180262r5r1vu2022L4AO>.

Goés, DF; Araújo, JM; Oliveira, NRS; Lima, RQ. Atividade tóxica do óleo essencial de piper duckei (*piperaceae*) sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 12, p. 96278-96284, 2020. <http://doi.org/10.34117/bjdv6n12-207>

Guarda, PM; Rambo, MKD; Jaconi, A; Guarda, EA; da Silva, JEC. Concentrações de metais tóxicos em água, solo e sedimento do rio Formoso, TO. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, e177101421897, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21897>.

Gray, CL; Hill, SLL; Newbold, T; Hudson, LN; Börger, L; Contu, S; Hoskins, AJ; Ferrier, S; Purvis, A; Scharlemann, JPW. Local biodiversity is higher inside than outside terrestrial protected areas worldwide. **Nature Communications**, v. 7, 12306, 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms12306>.

Grant, WF. Chromosome Aberration Assays in Allium: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Orlando, v. 99, n.3, p. 273-291, 1982. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-x](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-x).

Grant, WF. Higher Plant Assays for the Detection of Chromosomal Aberations and Gene Mutations – a Brief Historical Background on Their Use for Screening and Monitoring Environmental Chemicals. **Mutation Research**, Orlando, v. 426, n.6, p. 107-112, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00050-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00050-0).

Grippa GA; Morozesk M; Nati N; Matsumoto ST. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Rev. Bras. Toxicol.**, v. 23, n. 1-2, p. 11-6, 2010.

Guerra, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**, v. 44, ed. 8, p. 1737-1747, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00562-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00562-2).

Harbell, JW; Koontz, SW; Lewis, RW; Lovell, D; Acosta, D. Cell cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 35, p. 79-126, 1997.

Hassler, ML. A importância das unidades de conservação no Brasil. **Sociedade & Natureza**, v.17, n.33, p.79-89, 2006. <https://doi.org/10.14393/SN-v17-2005-9204>

Hayes, WJ; Laws, ER. **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego. Academic Press. 1991.

He, H; Luo, N; Huang, B; Li, B; Zhang, Z; Xu, Z; Pan, X. Optical characteristics and cytotoxicity of dissolved organic matter in the effluent and sludge from typical sewage treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 725, 138381, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138381>.

Hellou, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>.

Ingham, ER; Coleman, DC. Effects of streptomycin, cycloheximide, fungizone, captan, carbofuran, cygon and PCNB on soil microbe populations and nutrient cycling. **Microbial Ecology**, v. 10, n. 4, p. 345-358, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF02015559>.

James, RC; Roberts, SM; Williams, PL. Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications. **John Wiley & Sons**, 4th ed., New York, 592 p., 2022.

Jeyavani, J; Sibiya, A; Bhavaniramy, S; Mahboob, S; Al-Ghanim, KA; Nisa, Z; Riaz, MN; Nicoletti, M; Govindarajan, M; Vaseeharan, B. Toxicity evaluation of polypropylene microplastic on marine microcrustacean *Artemia salina*: An analysis of implications and vulnerability. **Chemosphere**, v. 296, 133990, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133990>.

Khatibisepehr, S; Huang, B; Ibrahim, F; Xing, JZ; Roa, W. Data-based modeling and prediction of cytotoxicity induced by contaminants in water resources.

Computational Biology and Chemistry, v. 35, n. 2, p. 69-80, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2011.02.001>.

Koerich, P; Gilson, IK; Vieira, MG; Barbosa, SC; Silva, MRV; Primel, EG; Radunz, AL; Cabrera, LC. Determinação de contaminantes emergentes no Rio Lontra (Salto do Lontra - Paraná). **Biodiversidade**, v. 20, n. 1, p. 106-121, 2021.

Kowata, EA; Ribeiro, JT; Telles, DD. Estudo da influência da turbidez e cor declinantes sobre a coagulação de água de abastecimento no mecanismo de adsorção - neutralização de cargas. **2º Simpósio de Iniciação Científica e Tecnologia e IX Expo-Edif**. São Paulo, 2000. Disponível em: <<http://bt.fatecsp.br/system/articles/115/original/trabalho5.pdf>>. Acesso em: 08 de fev. 2023.

Kronbauer, EA; Biondo, E; Zanetti, C; Kolchinski, EM. Agrotóxicos em água do rio e água tratada no município de Encantado, RS. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 14, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.24979/ambiente.v14i2.967>.

Kumar, D; Roy, R; Parashar, A; Raichur, AM; Chandrasekaran, N; Mukherjee, A; Mukherjee, A. Toxicity assessment of zero valent iron nanoparticles on *Artemia salina*. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 161-1627, 2017. <https://doi.org/10.1002/tox.22389>.

Kuperman, RG; Checkai, RT; Simni, M; Phillips, CT. Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 1, p. 48-53. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.010>.

Lerda, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mutation Research Letters**, v. 281, n. 2, p. 89-92. 1992. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90041-F](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90041-F).

Li, C; Zhou, K; Qin, W; Tian, C; Qi, M; Yan, X; Han, W. A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 28, n. 4, p. 380-394, 2019. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1592108>.

Lima, VF; Merçon, F. Metais pesados no ensino de química. **Química Nova na Escola**, v. 33, n. 4, p. 1-7, 2011.

Lionetto, MG; Calisi, A; Schettino, T. Earthworms biomarkers as tools for soil pollution assessment. **Soil Health and Land Use Management**, v. 16, p.305-331, 2012. <https://doi.org/10.5772/28265>.

Liu, B; Liu, X. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. **Science of the Total Environment**, v.320, n.2-3, p.269-274, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.08.005>.

Liu, T; Liu, Y; Fang, K; Zhang, X; Wang, X. Transcriptome, bioaccumulation and toxicity analyses of earthworms (*Eisenia fetida*) affected by trifloxystrobin and trifloxystrobin acid. **Environmental Pollution**, v. 265, part B, 115100. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115100>.

Lucas, EDO; Bernardo, JT; Mesquita, MO; Schmitz, JAK. Contamination of water resources by pesticides in the region center of Rio Grande do Sul, Brazil. **Reserach, Society and Development**, v. 9, n. 9, e242997128, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7128>.

Ma, TH; Xu, Z; Xu, C; McConnell, H; Rabago, EV; Arreola, GA; Zhang, H. The Improved Allium/Vicia Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Polluants. **Mutation Research**, Orlando, v. 334, n.2, p. 185-195, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1).

Macar, O. Multiple toxic effects of tetraconazole in *Allium cepa* L. meristematic cells. **Environ Sci Pollut Res**, v. 28, p. 10092–10099. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11584-4>.

Marinelli, CE; Creado, ESJ; Leuzinger, M; Irving, M; Weigand Jr, R; Mora, SA; Camargo, YR. Avaliação de impactos sociais de áreas protegidas no Brasil: caminhos e desafios. **Instituto Internacional de Educação do Brasil – IEB**. 71 p. Disponível em: <<https://www.wwf.org.br/?30664/Avaliacao-de-Impactos-Sociais-de-Areas-Protegidas-no-Brasil->>. Acesso em: 08 de fev. 2023.

Marsolla, LD. **Avaliação da adsorção do herbicida 2,4-D em carvão ativado em pó utilizando água com diferentes qualidades**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.

Matias, TP; Neto, TZC; Botzelli, L; Imperador, AM. The best-selling pesticides in Brazil: Implications for the environment and health. **Research, Society and Development**, v. 10, n.8, e12110817082. 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17082>.

Medeiros, R; Young, CEF. **Contribuição das unidades de conservação brasileiras para a economia nacional: Relatório Final**. Brasília-DF: UNEP/WCMC, 2011.

Mendes, BG; Budziak, D; Stolberg, J; Peixer, ZI; Dalmarco, JB; Simionato, EL; Pedrosa, RC; Felipe, KB; Ogawa, J; Pegoraro, C; Scheffer, L; Besen, MR; Oliveira, LJGG; Geremias, R. Estudo da qualidade das águas do Rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 2, p. 43-58, 2011. <https://doi.org/10.18316/260>.

Mercado SAS; Caleño JDQ. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Sci Total Environ**, 700:134452. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>.

Mosmann, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Negrão, GN; de Oliveira, BHM; Butik, M. Monitoramento Ambiental de metais pesados em macrófita aquática pela análise de espectrometria de absorção atômica

- AAS na Bacia do Rio Cascavel, Guarapuava, PR. **Revista Georaguiaia**, v. 11, n. 1, p. 338-354, 2021.

Neto, ME; da Silva, WO; Rameiro, FC; Nascimento, ES; Alves, AS. Análises físicas, químicas e microbiológicas das águas do Balneário Veneza na Bacia Hidrográfica do médio Itapecuru, MA. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.3, p.397-403, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aib/a/Vqj5RpWGcSHJ5LFwVXPFxLf/>>. Acessado em: 20 de ago. de 2023.

Norman, AW; Litwack, G. **Hormones (2 ed.)**. Boston: Academic Press, 1997. 558p.

Nunes, ACG. **O efeito do pro-carcinogénico 17 β -estradiol na captação de nutrientes essenciais para as células MCF-7**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular). Universidade de Aveiro. Portugal.

Oga, S; Camargo, MAA; Batistuzzo, JAO. Fundamentos da toxicologia. 3ª edição. São Paulo: **Atheneu Editora**, 2008.

Okumu, MO; Mbaria, JM; Gikunju, JK; Mbutia, PG; Madadi, VO; Ochola, FO; Jepkorir, MS. *Artemia salina* as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. **Toxicon: X**, v. 12, 100082, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100082>.

Oliveira, LM; Voltolini, JC; Barbério, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, v.6, n., p. 90-103. 2011. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.176>.

Organization for Economic Cooperation and Development - OECD. **Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD 207 – Earthworm, acute toxicity tests (Guideline for testing of chemicals, 207)**. Paris, 1984.

Padilha, CF; Leitzke, FLS. **Determinação de Hormônios Sexuais Femininos na Bacia do Alto Rio Iguaçu na região de Curitiba - PR**. Curitiba, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Parvan, LG; Leite, TG; Freitas, TB; Pedrosa, PAA; Calixto JS; Agostinho, LA. *Allium cepa* bioassay reveals genotoxicity of flumioxazin herbicide. **Revista Pan-Amazonica de Saúde**, v. 11, e202000544, 2020. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000544>.

Paterniani, JES; Pinto, JM. Qualidade da água. In: Miranda, JH; Pires, RCM. **Irrigação**. 1ª ed. Campinas. SBEA, v. 1, p. 195-253, 2001. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/134369>>. Acesso em: 08 de fev. 2023.

Pavan, LG; Leite, TG; Freitas, TB; Pedrosa, PAA; Calixto, JS; Agostinho, LA. Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Rev Pan Amaz Saúde**, 11:e202000544. 2020. <http://doi.org/10.5123/S2176-6223202000544>.

Peduto, TAG; Jesus, TA; Kohatsu, MY. Sensibilidade de diferentes sementes em ensaio de fitotoxicidade. **Bras. Cien, Tec. e Inov.**, v. 4, n. 2, p. 200-212, 2019. <https://doi.org/10.18554/rbcti.v4i2.3698>.

Peres, F; Moreira, JC. É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 384 p. 2003. Disponível em: <<https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>>. Acesso em: 12 de fev. 2023.

Petrie, B; Barden, R; Kasprzyk-Hordern, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v.72, p.3-27, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.

Philippi Junior, A; Roméro, MA; Bruna, GC. **Curso de Gestão Ambiental**. 2. ed. Barueri: Manole, 1245 p., 2014.

Pignati, WA; Lima, FANDS; Lara, SSD; Correa, MLM; Barbosa, JR; Leão, LHDC; Pignatti, MG. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

Pinheiro, A; da Silva, MR; Kraish, R; Molozzi, J; Dias, AS; Júnior, AW. Avaliação da ocorrência de agroquímicos em águas superficiais da Bacia do Itajaí/SC. **Rega**, v. 7, n. 2, p. 17-26, 2010.

Piratoba, ARA; Ribeiro, HMC; Morales, GP; Gonçalves, WG. Caracterização de parâmetros de qualidade da água na área portuária de Barcarena, PA, Brasil. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12 n. 3, 2017. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1910>

Prestes, TH; Gibbon, DO; Lansarin, MA. Degradação Fotocatalítica do fungicida Tebuconazole em solução aquosa. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 798-801, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400006>.

Primel, EG; Zanella, R; Kurz, MHS; Gonçalves, FF; Machado, SO; Marchezan, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v.28, n.4, p.605-609, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400010>.

Przyvara, APM. **Unidade de Conservação ambiental Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas: uma transposição de saberes para o ensino de biologia**. Ponta Grossa, 2020. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Rajabi, S; Ramazani, A; Hamidi, M; Najji, T. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 16, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>.

Reinecke, AJ; Reinecke, SA. The influence of heavy metals on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Pedobiologia**, v. 40, n. 5, p. 439-448. 1996.

Restrepo, JCPS; Antonelo, DI; Pokrywiecki, TS; Tonial, IB; Manosso, FC; Almeida, IG; Vicentini, VEP; Düsman, E. Changes in physicochemical and toxicological parameters of waters of Trincheira's River caused by road construction. **Revista Ambiente e Água**, v. 14, n. 4, e2360, 2019. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2360>.

Rocha, JRASC; Pimentel, AJB; Ribeiro, G; Souza, MA. Eficiência de fungicidas no controle da brusone em trigo. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.4, p.347-352, 2014. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1937>.

Rogero, SO; Lugão, AD; Ikeda, TI; Cruz, AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>.

Rylands, AB; Brandon, K. Unidades de conservação brasileiras. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 27-35, 2005.

Schmitt, GT; Kieling, AG; Caetano, MO. Avaliação da remoção de 17 β -estradiol em água por adsorção com cinza de casca de arroz. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. **30º Congresso ABES**, IV-051. 2019.

Schöninger, FCC. **Diagnóstico da qualidade da água e do sedimento do Rio Chopim no Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas - PR**. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão.

Schutz, DL; de Marco, IG; Alves, GL; Vincoski, JVA; Ishikawa, S; Schmitz, APO; Gomes, EMV; Manosso, FC; Tonial, IV; Pokrywiecki, JC; Lingnau, R; Pokrywiecki, TS; Düsman, E.

Biomonitoring of surface water quality in the Chopim River within the Conservation Unit Campos de Palmas Wildlife Refuge, southern Brazil. **Environ. Monit. Assess**, v. 193, n. 11, p. 738, 2021. <http://doi.org/10.1007/s10661-021-09464-6>.

Schutz, DL; de Marco, IG; Alves, GL; Vincoski, JVA; Ishikawa, S; Schmitz, APO; Gomes, EMV; Manosso, FC; Tonial, IB; Pokrywiecki, JC; Lingnau, R; Pokrywiecki, TS; Düsman, E. Biomonitoring of surface water quality in the Chopim River within the Conservation Unit Campos de Palmas Wildlife Refuge, southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, p. 738, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09464-6>.

Schutz, DL; de Marco, IG; Teles, AGDX; Schmitz, APO; Gomes, EMV; Manosso, FC; Tonial, IB; Pokrywiecki, JC; Lingnau, R; Pokrywiecki, TS; Módenes, APN; Quiñones, FRE; Düsman, E. Soil toxicity in a protected area in Brazil: Cytotoxic, genotoxic, and toxic effects. **Sci. Total Environ.**, 892:164564, 2023. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164564>.

Scorsafava, MA; Souza, A; Stofer, M; Nunes, CA; Milanez, TV. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 229-232, 2010. <https://doi.org/10.53393/rial.2010.v69.32661>.

Sieklicki, J; Bione, NCP; Oliveira, PC; Souza, VF; Martins, KG. Relationships between land use and water quality obtained for the evaluation of genotoxic effects in plant bioindicators. **Ambiente & Água**, v. 14, nº. 2, 2019. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2299>.

Silva, APS; Silva, TS; Santos, AA; Ribeiro, KG; Marques, MMM; Almeida, PM; Peron, AP. Toxicity of Carmine Cochineal and Caramel IV Dyes to Terrestrial Plants and Microcrustaceans. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, 313, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04690-z>.

Silva, DCVR; Pompêo, M; Paiva, TCB. A Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, p. 340-353, 2015.

Silva, J; Erdtmann, B; Henriques, JAP. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, Alcance, 422 p. 2003.

Silva, RR; Santos, JCV; Silva, YA; Paiva, SC; Sarubbo, LA; Luna, JM. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da água de um trecho do Rio Capibaribe, no município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 6, p. 62847-62866, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-591>

Silva, TM; Fracasso, DS; Visentin, APV; Cassini, C; Scariot, FJ; Danetti, S; Echeverrigaray, S; Moura, S; Touguinha, LB; Branco, CS; Salvador, M. Dual effect of the herbal matcha green tea (*Camellia sinensis* L. kuntze) supplement in EA.hy926 endothelial cells and *Artemia salina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 298, 115564, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115564>.

Silveira, JS; Lopes, FA. Inconformidade do enquadramento de corpos d'água em Unidades de Conservação de Proteção Integral: Proposta de revisão para a bacia do Ribeirão da Prata – Parque Nacional Serra do Gandarela – Minas Gerais. **Revista Geografias**, v. 18, n. 1, 20 p., 2022. <https://doi.org/10.35699/2237-549X%20.2022.37570>.

SIMEPAR. **Sistema Meteorológico do Paraná**. Disponível em: <<http://www.simepar.br>>. Acesso em 13 mar. 2023.

Singh, S; Singh, N; Kumar, V; Datta, S; Wani, AB; Singh, M; Singh, K; Singh, J. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, p. 317-329, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0566-2>.

Siqueira, JO; Carneiro, MAC. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to sucessional groups in Southeastern Brazil. **For.**

Ecol. Manag., v. 107, p. 241-252, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(97\)00336-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(97)00336-8).

Sivakumar, S. Effects of metals on earthworm life cycles: a review. **Environmental and Monitoring Assessment**, v. 187, n. 530, p. 4742, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4742-9>.

SNUC. Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. **Capítulo IV da Criação, Implantação e Gestão das Unidades de Conservação**. 2000. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.htm>. Acesso em 13 mar. 2023.
Solano, GSM; Andrioli, NB. Genotoxic effects induced by iprodione and tebuconazole in meristematic cells of *Allium cepa*: responses dependent on concentration and exposure time. **Environ Sci Pollut Res**, 31, 17289–17298. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32351-9>.

Spadotto, CA. **Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos**. In: IV Jornada Jurídica da FMR, 2006, São Manuel/SP. IV Jornada Jurídica da FMR, 2006.

STCP – Consultoria e Engenharia de Projetos Ltda. **Relatório do Meio Biológico: Plano de Manejo do RVS-CP**. Curitiba: 2013.

Stominsky, MP; Bortolotto, VLS; Andrezza, JK. **Estudo da remoção de desreguladores endócrinos utilizando adsorção como método de tratamento de água**. 2022. Disponível em: <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/24619/1/TCC%20revis%c3%a3o%20final.pdf>>. Acesso em 01 jun. 2023.

Strapazzon, MC. **Reflexões acerca das racionalidades em Unidades de Conservação: o caso do Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas**. Pato Branco, 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Suares Rocha, P; Azab, E; Schmidt, B; Storch, V; Hollert, H; Braunbeck, T. Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 550-558, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.017>.

Teles, AGDXT; Gomes, EMV; Pokrywiecki, JC; Schmitz, APO; Pokrywiecki; Düsman, E. Characterization and Ecotoxicity of Raw and Treated Liquid Efluent from the Washing of Soybean Seed Treatment Machines. **Water Air Soil Pollut**, 235:66. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11270-024-06883-2>.

Teles, IB; Florentino, LA; Ramirio, LD; Brunini, RG; Pereira, WR. Análise da qualidade das águas do rio Mogi-Guaçu por meio de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. **Reserach, Society and Development**, v. 11, n. 11, e73111133285, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33285>.

Trintinaglia, L; Bianchi, E; Silva, LB; Nascimento, CA; Spilki, FR; Ziulkoski, AL. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin.

Brazilian Journal of Biology, v. 75, p. 75-80, 2015. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.0113>.

Verbinnen, RT; Nunes, GS; Vieira, EM. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v.33, n.9, p.1837-1842, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900003>.

Viana, LF; Francisco, LFV; Cardoso, CAL; Solórzano, JCJ; Lima-Junior, SE. Avaliação do índice de vegetação e da concentração de metais em sedimentos na Microbacia Tarumã, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e806974862, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4862>.

Wu, R; Zhou, T; Wang, J; Wang, Wang, J; Du, Z; Li, B; Juhasz, A; Zhu, L. Oxidative stress and DNA damage induced by trifloxystrobin on earthworms (*Eisenia fetida*) in two soils. **Science of The Total Environment**, v. 797, 149004. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149004>

Yasmin, S; D'Souza, D. Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review. **Applied and Environmental Soil Science**, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/678360>.

Yu, MH; Tsunoda, H; Tsunoda, M. Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants. **CRC Press**, 2nd ed., Boca Raton, 397 p., 2011.

Zakrzewski, SF. Principles of Environmental Toxicology. **American Chemical Society**, 2nd ed., Washington, 320 p., 1997.