



Revista Brasileira de Geografia Física

Homepage: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbge>



Toxicity at Different Trophic Levels of the Lageado Guamirim River Waters After a Rainy Event

Valdemar Batista dos Santos¹, Anna Karolina Gomes Oliveira¹, Patricia Aline Bressiani¹, Guilherme Henrique Berton², Eduardo Michel Vieira Gomes³, Juan Carlos Pokrywiecki⁴, Ticiane Sauer Pokrywiecki⁴, Elisângela Dusman^{5*}

¹ Postgraduate Student in Environmental Engineering: Environmental Analysis and Technology, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná* (UTFPR), Câmpus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil, valdemar@alunos.utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0009-0002-5265-106x>), annoli@alunos.utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0009-0008-9872-0546>), pbressiani@alunos.utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0000-0001-7449-4646>). ² Scholar in Chemical Engineering, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná* (UTFPR), Câmpus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil, guilhermehenriqueberton@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-8224-5671>). ³ Department of Physics, Statistics and Mathematics, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná* (UTFPR), Francisco Beltrão, PR, Brazil, eduardogomes@utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0000-0002-4341-0021>). ⁴ Department of Engineering, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná* (UTFPR), Câmpus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil, juan@utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0000-0002-2226-2517>), ticiane@utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0000-0001-7453-9373>). ⁵ Department of Chemistry and Biology, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná* (UTFPR), Câmpus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil, edusman@utfpr.edu.br (<https://orcid.org/0000-0002-4483-5638>). *Corresponding author: Department of Chemistry and Biology, *Universidade Tecnológica Federal do Paraná* (UTFPR), Linha Santa Bárbara s/n, Postal Code 85601-970 – Postal Box nº 165 - Francisco Beltrão - PR - Brazil. Phone: +55-46-3520-2600. E-mail: edusman@utfpr.edu.br (Elisângela Dusman)

Artigo recebido em 05/01/2024 e aceito em 02/06/2024

ABSTRACT

The Lageado Guamirim River belongs to a watershed with several environmental problems. Therefore, the objective of this study was to use liver cells (HuH7.5) and earthworms (*Eisenia fetida* L.) to evaluate the toxicity of the river waters after a rainy event, through the MTT test (for 24, 48 and 72 hours) and the escape test (48 hours) correlating with the physical chemical analysis data. The samples were collected in five points. The physicochemical analyzes indicate that the samples of points 3, 4 and 5 (501, 503 and 601) presented values above the permitted by the legislation for the phosphorus content and the samples of points 1, 3, 4 and 5 (501) presented the highest levels of chemical oxygen demand. According to the results of leakage rate, points 1, 3 and 5 (501, 502, 503 and 601) showed toxic effect to the bioindicator *E. fetida*, with positive correlation by principal component analysis (PCA) with phosphorus content. The MTT test showed increased cell viability at points 3, 4 and 5 (501, 502, 503 and 601), at times of 48 and/or 72 hours at the highest concentration (1:10), with positive correlation by PCA with phosphorus content and chemical oxygen demand. Despite this, the rainy event did not interfere in the toxicity, because in the ascent and descent of the river toxicity was identified. Thus, a constant monitoring of the waters of this watershed is necessary in order to identify the polluting sources.

Keywords: bioindicator; ecotoxicity; escape test; MTT; HuH7.5.

Toxicidade em Diferentes Níveis Tróficos das Águas do Rio Lageado Guamirim Após um Evento Chuvoso

RESUMO

O Rio Lageado Guamirim pertence a uma bacia hidrográfica com diversos problemas ambientais. Logo, o objetivo deste trabalho foi utilizar células hepáticas (HuH7.5) e minhocas (*Eisenia fetida* L.) para avaliar a toxicidade das águas deste rio após um evento chuvoso, através do teste do MTT (por 24, 48 e 72 horas) e do teste de fuga (48 horas), correlacionando com os dados das análises físico químicas. As amostras foram coletadas em cinco pontos. As análises físico-químicas indicam que as amostras dos pontos 3, 4 e 5 (501, 503 e 601) apresentaram valores acima do permitido pela legislação para o teor de fósforo e as amostras dos pontos 1, 3, 4 e 5 (501) apresentaram os maiores teores de demanda química de oxigênio. De acordo com os resultados de taxa de fuga, os pontos 1, 3 e 5 (501, 502, 503 e 601) apresentaram efeito tóxico ao bioindicador *E. fetida*, com correlação positiva pela análise de componentes principais (PCA) com o teor de fósforo. O teste do MTT apresentou aumento da viabilidade celular nos pontos 3, 4 e 5 (501, 502, 503 e 601), nos tempos de 48 e/ou 72 horas na maior concentração (1:10), com correlação positiva pela PCA com o teor de fósforo e a demanda química de oxigênio. Apesar disso, o evento chuvoso não interferiu na toxicidade, pois na subida e descida do rio foi identificada

Santos, V. B., Oliveira, A. K. G., Bressiani, P. A., Berton, G. H., Gomes, E. M. V., Pokrywiecki, J. C., Pokrywiecki, T. S., Dusman, E.

toxicidade. Assim, é necessário um monitoramento constante das águas desta bacia hidrográfica, a fim de identificar as fontes poluidoras.

Palavras-Chave: bioindicador; ecotoxicidade; teste de fuga; MTT; HuH7.5.

Introdução

O escoamento de águas pluviais poluídas é uma das ameaças mais importantes à qualidade da água no mundo desenvolvido (McIntyre et al., 2015). Liu et al. (2024) mostraram que a expansão das áreas de terras cultivadas, pastagens e áreas urbanas estava associada ao aumento do escoamento fluvial, enquanto um aumento na área florestal conduz a uma diminuição no escoamento fluvial.

Os resíduos provenientes de atividades antrópicas, como resíduos industriais, agrícolas e domésticos lançados em águas superficiais, tornaram-se uma questão ambiental devido aos seus potenciais efeitos tóxicos nos ecossistemas aquáticos. Esses poluentes podem causar efeitos letais e subletais aos organismos, além de afetar a saúde das populações humanas expostas à água potável (Nunes et al., 2011; Musoke et al., 2018).

Os eventos chuvosos contribuem para a lixiviação de poluentes que podem atingir os corpos hídricos exacerbando os problemas de qualidade da água. Vale ainda destacar o aumento da frequência e intensidade dos eventos de chuvas intensas devido às mudanças climáticas (Wang et al., 2025).

O escoamento urbano pode contribuir para o aumento da toxicidade e os efeitos dependem do tempo de retenção, do volume de água e do tipo e composição do lixiviado (Khanal et al., 2019). O uso do solo e a precipitação foram destacados por Shi et al. (2025) como dois fatores importantes que afetam a poluição por fósforo do escoamento das bacias hidrográficas. Além disso, a urbanização tornou-se uma tendência irreversível e as respostas do escoamento superficial à mesma ainda precisam ser exploradas mais profundamente dentro de extensões urbanas com disponibilidade limitada de dados (Huang et al., 2024).

O Rio Lageado Guamirim, localizado no município de São Miguel do Oeste no estado de Santa Catarina, sul do Brasil, foi uma importante fonte de contribuição para o surgimento, crescimento e desenvolvimento do município (Collaço, 2003). Entretanto, o aumento de construções irregulares ocupando as Áreas de Preservação Permanente (APPs), assim como a poluição do rio através do despejo de lixo, esgoto e dejetos, além da carência de arborização em determinados trechos, tem resultado em problemas ambientais em suas águas e aumentado as

condições de enchentes, alagamentos e inundações (Maziero e Tomazoni, 2016).

Embora as análises físicas e químicas sejam comuns para monitorar a presença e a quantidade de substâncias tóxicas nas águas (Pellacani et al., 2006). Esses métodos não são suficientes para estimar os efeitos dessas substâncias sobre os organismos vivos e os riscos ambientais que elas representam. Por isso, os testes de toxicidade são uma ferramenta complementar importante para avaliar o impacto da contaminação das águas superficiais sobre a biota (Iliopoulou-Georgudaki et al., 2003; Costa et al., 2008; Bianchi et al., 2019).

Nesse contexto, os bioindicadores e biomarcadores são fundamentais para relacionar as respostas biológicas com os mecanismos de toxicidade e patologias associadas, devido ao contato com agentes xenobióticos (Gupta, 2019). Também podem ser realizados testes de toxicidade aguda que avaliam a letalidade, mortalidade, alterações celulares, mudanças de biomassa, taxas de reprodução e mudanças comportamentais dos indivíduos (Trintinaglia et al., 2015).

As minhocas (*Eisenia fetida* L.) se destacam como bioindicadores em testes ecotoxicológicos (Zorn et al. 2008; Espinosa-Reyes et al. 2019; Cesar et al., 2022; Santos et al., 2022). A *E. fetida*, com o teste de fuga, é uma importante fonte de informação ecotoxicológica, devido à sua capacidade de excretar e acumular compostos orgânicos tóxicos e metais (Cotta et al., 2020). Estudos recentes (Shao et al., 2022; Wen et al., 2022; Shao et al., 2023; Wen et al., 2023; Chen et al., 2024) exploram a relação entre minhocas como bioindicadores e os efeitos de eventos chuvosos na qualidade do solo e da água. Minhocas, através de suas atividades de escavação e alimentação, influenciam diretamente os processos hidrológicos e a ciclagem de nutrientes no solo, tornando-se importantes bioindicadores da saúde do ecossistema

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são utilizados para a detecção de possíveis agentes danosos ao recurso hídrico (Trintinaglia et al., 2015), avaliando as alterações presentes nas células devido a mecanismos externos (Fenech, 2000). Um teste comumente utilizado é o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), que é amplamente aplicado em células de mamíferos e, tem como base, a detecção de

degenerações celulares causadas por poluentes, tendo como resultado a morte celular (Fenech, 2000).

Além disso, a aplicação de ensaios de citotoxicidade, como o teste do MTT, continua sendo uma prática valiosa na detecção de agentes tóxicos, conforme discutido por diversos autores (Moreira et al., 2022, Lin et al., 2022, Lin et al., 2024 e Sun et al., 2024). Essas publicações corroboram a necessidade de estudos integrados que combinam métodos físico-químicos e biológicos para uma avaliação mais abrangente da qualidade dos recursos hídricos e dos riscos ambientais.

Zhang et al. (2011) destacam que a compreensão da magnitude da toxicidade do escoamento urbano para os organismos é importante para o gerenciamento eficaz da qualidade dos recursos hídricos. Além disso, existem poucas informações disponíveis sobre como a precipitação afeta a dinâmica de nutrientes dos rios (Wnag et al., 2025) e, menos ainda é a correlação da chuva com a toxicidade aos bioindicadores.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar a linhagem de células hepáticas humanas (HuH7.5) e as minhocas (*E. fetida*) para avaliar a toxicidade das águas do Rio Lageado Guamirim após um evento chuvoso, através do teste do MTT e do teste de fuga, correlacionando com os dados das análises físico químicas das amostras a fim de avaliar os efeitos dos poluentes e contribuir para estratégias de monitoramento e mitigação.

Material e métodos

Local de estudo

O rio Lageado Guamirim nasce no perímetro urbano do município de São Miguel do Oeste, localizado na região Extremo-Oeste do estado de Santa Catarina (SC), e une-se ao Rio Famoso em sua porção sul, seguindo em direção ao município de Descanso - SC, local onde suas águas são utilizadas para abastecimento do município. A bacia do rio Lageado Guamirim é uma sub-bacia pertencente à bacia hidrográfica do rio Peperi-Guaçu e possui uma extensão de aproximadamente 19 km².

Pontos de coleta

Foram coletadas amostras de cinco pontos do Rio Lageado Guamirim (Figura 1) no final da Santos, V. B., Oliveira, A. K. G., Bressiani, P. A., Berton, G. H., Gomes, E. M. V., Pokrywiecki, J. C., Pokrywiecki, T. S., Dusman, E.

estação inverno, no dia 21 de setembro de 2021, sendo que nesta data choveu 24,2 mm (Cemaden, 2021).

Os pontos 1 (nascente), 2 e 3 encontram-se no perímetro urbano do município de São Miguel do Oeste, com distância menor que 1 km entre eles. Em contrapartida, os pontos 4 e 5 localizam-se na região rural do município, com o ponto 4 a 3,5 km de distância do ponto 3 e afastado apenas a 1 km do perímetro urbano. O ponto 5 é o exutório do rio e, neste ponto, foram realizadas coletas durante a subida (501, 502 e 503 – nível mais alto) e descida (601) do rio após o evento chuvoso (Figura 1).

A coleta e armazenamento das amostras de água do Rio Lageado Guamirim foram realizadas de acordo com as instruções e métodos contidos no "Standard Methods" (Apha, 2012). As amostras foram coletadas através de um balde e armazenadas em garrafas plásticas devidamente identificadas e posteriormente armazenadas em caixa isotérmica e transportadas ao laboratório de Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Francisco Beltrão-Paraná-Brasil, onde permaneceram congeladas ($T \leq 4^{\circ}\text{C}$) para posterior análise.

Análises químicas

As análises químicas das amostras de água foram realizadas seguindo metodologias descritas no "Standard Methods" (Apha, 2012), e foram avaliados os parâmetros demanda química de oxigênio (DQO) e fósforo total.

Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para a análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO), utilizou-se o método de refluxo fechado com análise colorimétrica (Apha, 2012, Assumpção e Morita, 1968). A DQO quantifica a quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente toda a matéria orgânica e inorgânica presente na amostra. O dicromato de potássio ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) foi o oxidante específico utilizado, resultando na redução de Cr^{6+} para Cr^{3+} e na mudança de coloração da amostra de laranja para verde. Essa medida é essencial para avaliar a contaminação de águas e efluentes.

A análise foi realizada em meio ácido, com adição de ácido sulfúrico concentrado à amostra. O método de refluxo fechado foi escolhido para evitar a perda de compostos orgânicos voláteis. A solução digestora foi preparada dissolvendo-se 10,216 g de dicromato de potássio, previamente seco a 150 °C

por 2 horas, em 500 mL de água destilada, seguido da adição de 167 mL de ácido sulfúrico concentrado e 33,3 g de sulfato de mercúrio. Esta solução foi diluída para 1000 mL após resfriamento. Também se preparou uma solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado, deixando-a em repouso por 1 ou 2 dias para completa dissolução. O padrão de biftalato de potássio foi preparado dissolvendo-se 0,425 g de hidrogenoftalato de potássio, previamente seco a 110 °C por 1 hora, em 1000 mL de água destilada, resultando em uma solução com DQO teórica de 500 mg O₂.L⁻¹.

A curva de calibração foi preparada adicionando a solução digestora, ácido sulfúrico, água destilada e solução de biftalato de potássio em tubos de ensaio, que foram vedados, invertidos para mistura completa, digeridos a 150 °C por 2 horas, resfriados e medidos no espectrofotômetro a 600 nm. O mesmo procedimento foi aplicado às amostras, com adição da solução digestora e ácido sulfúrico, seguidos de digestão, resfriamento e leitura da absorbância.

Os resultados foram expressos como concentração de O₂ (mg.L⁻¹), calculada a partir da curva de calibração e das absorvâncias medidas.

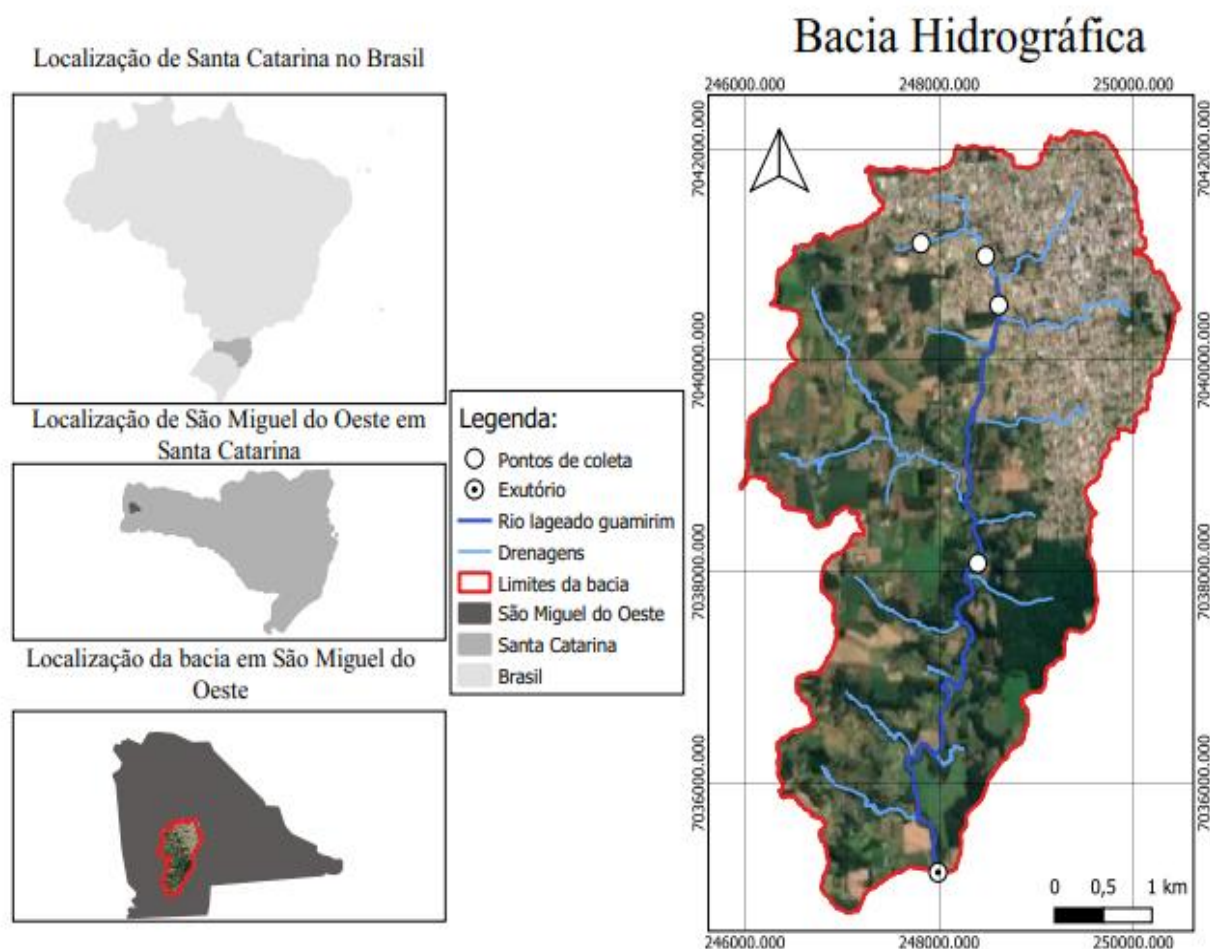


Figura 1. Localização Nacional, Estadual e Municipal da Bacia Hidrográfica do Rio Lageado de Guamirim e dos pontos de coleta.

Fósforo total

Para a determinação do fósforo total seguiu-se a metodologia da Apha (2012). Foi preparada a solução de fosfato biácido de potássio, 0,4395 g do composto foi dissolvido em 500 mL de água destilada, transferido para um balão

volumétrico de 1000 mL, adicionado de 5 gotas de formol e completado com água destilada. A solução de ácido sulfúrico em álcool foi preparada adicionando 42 g de ácido sulfúrico em um balão volumétrico de 250 mL, seguido de 84 mL de álcool etílico e completado com água destilada. A solução de molibdato de amônio foi preparada dissolvendo-se 5 g do composto em água destilada aquecida a aproximadamente 70 °C. Para a solução

de cloreto estanoso, 1,6 g do composto foi dissolvido em ácido clorídrico, agitado e completado para 100 mL com água destilada.

No procedimento experimental, 100 mL da amostra foram colocados em um erlenmeyer, enquanto outro erlenmeyer continha 100 mL de água destilada como controle. Em cada erlenmeyer, foram adicionados 5 mL da solução de ácido sulfúrico e 10 gotas da solução de molibdato de amônio. Após a agitação, foram adicionadas 10 gotas da solução de cloreto estanoso e a mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. A coloração azul resultante foi mais intensa na amostra do que na água destilada. A solução de fosfato biácido de potássio foi utilizada na titulação até que a coloração dos erlenmeyers se igualasse.

Os resultados foram expressos em mg.L⁻¹ de P, com base no volume de titulação necessário para obter a mesma tonalidade de cor nos erlenmeyers.

Teste de fuga com *E. fetida*

O ensaio de fuga foi realizado em triplicata segundo a norma NBR ISO 17512-1 (Brasil, 2011). As minhocas utilizadas foram as da espécie *E. fetida* e possuíam clitelo bem desenvolvido e massa corporal de 300 a 600 mg. Utilizou-se uma adaptação do solo artificial tropical (SAT) proposto pela (Oecd, 1984), como solo para os ensaios de fuga, constituído por uma mistura de areia fina seca e peneirada (70%), caulim em pó (20%) e fibra de coco em formato de chips (10%).

A umidade do solo foi ajustada para 60% da capacidade de retenção de água, utilizando água filtrada para o grupo controle negativo, solução de ácido bórico (750 mg H₃BO₃ kg⁻¹ de solo SAT) para o solo controle positivo e as amostras coletadas para avaliação de suas toxicidades.

O solo foi distribuído em recipientes retangulares de propileno, com altura 115 mm, e dimensões 175 x 132 mm. A tampa dos recipientes foi perfurada, e seu volume no interior dividido ao meio por um divisor plástico removível. Metade de sua capacidade foi preenchida com o SAT + controle negativo e a outra metade com SAT + controle positivo ou amostras de água do Rio Lageado Guamirim.

Também foi realizado um controle dual, onde ambas as partes foram preenchidas com SAT + controle negativo. Esse processo verifica o atendimento a um dos critérios de validação do ensaio: a distribuição homogênea dos organismos nos recipientes-teste na ausência de contaminantes.

Também se analisou o número de minhocas mortas durante o tempo do ensaio, pois o teste apenas é validado se esse número for menor que 10% em cada recipiente.

Após a montagem, 10 minhocas (*E. fetida*) foram depositadas na linha divisória entre os dois solos, sendo removida a compartimentação do recipiente. Os recipientes foram mantidos no escuro por 48 horas, após esse período recolocou-se o divisor de plástico em todos os recipientes e realizou-se a contagem dos organismos de cada seção dos recipientes.

A análise dos dados foi realizada em termos de porcentagem de fuga, de acordo com a equação (1).

$$\% = [(Nc - Nt)/N] \times 100\% \quad (1)$$

Onde:

% = porcentagem de fuga;

Nc = número de minhocas encontradas no solo-controle;

Nt = número de minhocas encontradas no solo-teste;

N = número total de minhocas.

Para verificar a significância da resposta de fuga foi utilizado o teste estatístico de Fisher unicaudal, utilizando os dados da média desvio padrão do número de organismos encontrados em cada seção do recipiente de cada tratamento e do controle dual, pelo programa *Action Stat*. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de *p* for menor que 0,05.

O solo é considerado tóxico quando a taxa de fuga é maior que 60%, ou seja, mais de 80 % dos organismos expostos preferem o solo controle. Caso o percentual de fuga seja negativo, ou seja, o bioindicador prefere o solo teste a porcentagem de fuga é considerada como 0%.

Teste de citotoxicidade com cultura de células de mamíferos

As células HuH7.5 (fígado humano) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa incubadora tipo BOD a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Para realizar o teste da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium

bromide], de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações.

Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células HuH7.5, com exceção do poço de controle sem célula (branco). Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 μL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO^-) (meio de cultura), controle positivo (CO^+) com o agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 500 μM) e os tratamentos com cada amostra de água coletada do Rio Lageado Guamirim, diluída em meio de cultura, nas concentrações 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v, amostra/meio de cultura). No momento do uso, as amostras foram descongeladas e filtradas utilizando microfiltros com porosidade de 0,22 μm , para uma máxima retenção de microrganismos que pudessem estar presentes.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas, e na sequência, foi descartado o meio contendo MTT e aos poços foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 560 nm.

Os dados das absorbâncias médias do teste MTT foram verificados por análise de normalidade e variância, pelo programa *Action Stat*. Como os resultados apresentaram normalidade e homocedasticidade foi aplicado o teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$; $n = 6$), para comparação dos resultados dos tratamentos com o resultado do controle negativo.

Os valores de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância no tratamento e a absorbância do controle negativo, conforme Equação 2.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO^-}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

ABS_T = Absorbância do tratamento;

ABS_{CO^-} = Absorbância do controle negativo.

Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise dos componentes principais foi realizada utilizando o programa Past 4.03. Para análise estatística e montagem da matriz de dados Santos, V. B., Oliveira, A. K. G., Bressiani, P. A., Berton, G. H., Gomes, E. M. V., Pokrywiecki, J. C., Pokrywiecki, T. S., Dusman, E.

foram plotados os pontos de coleta, os dados de cada teste de ecotoxicidade (absorbância média em cada tempo de avaliação do teste do MTT e percentual de fuga) e os parâmetros físico-químicos (DQO e fósforo). Os valores foram expressos em diagramas de dispersão utilizando os componentes principais 1 e 2, que representaram 40,10% e 32,57% dos dados.

Resultados e discussões

Análises físico químicas

Os dados das análises físico-químicas (Tabela 1) indicam que as amostras dos pontos 3, 4 e 5 apresentaram valores acima do permitido pela legislação do CONAMA N° 357/2005 (Brasil, 2005) para o teor de fósforo. Embora o fósforo seja essencial para a biota aquática, também pode acelerar a eutrofização quando presente em excesso (Chislock et al., 2013). Este nutriente é um constituinte comum de fertilizantes agrícolas, esterco e resíduos orgânicos (Moreira et al., 2022), assim, uma das possíveis razões para a presença de fósforo acima do limite da legislação pode ser o uso de fertilizantes nas lavouras, visto que os pontos com maior concentração de fósforo foram os pontos de área rural (pontos 4 e 5). Além disso, o lançamento de efluentes domésticos também é uma fonte de fósforo, o que justifica a elevada presença deste nutriente no ponto 3. Resultado semelhante foi observado no estudo de Marcolin et al. (2020), em que pontos localizados na área urbana de microbacias hidrográficas do extremo sul da Bahia-Brasil apresentaram valores de fósforo extrapolados de acordo com os limites da legislação.

Pode-se observar que a amostra correspondente ao nível máximo do Rio Lageado Guamirim após o evento chuvoso (ponto 503), foi o apresentou maior teor de fósforo dentre todos os pontos de coleta. Este resultado corrobora com o indicado por Okumura et al. (2020), em que o período chuvoso foi agravante para a qualidade da água do Rio dos Frades-Bahia-Brasil. Wang et al. (2025), avaliando os efeitos da precipitação sobre a dinâmica de nutrientes em um rio agrícola drenando para o Lago Qiandaohu, um reservatório do sudeste da China, também confirmaram que a concentração de fósforo total aumentou continuamente com o aumento da intensidade da chuva.

As amostras dos pontos 1, 3, 4 e 5 apresentaram teores de demanda química de

oxigênio acima do permitido pela legislação do CONAMA Nº 357/2005 (Brasil, 2005). Devido à localização deste rio, tanto em área urbanizada, com predominância de áreas residenciais, comerciais e industriais, quanto em área rural, pode-se destacar que a carga poluidora se deve à elevada ocupação urbana, aos esgotos domésticos e outros poluentes. Okumura et al. (2020) também verificaram que o uso e ocupação do solo exerce forte pressão antrópica sobre o Rio dos Frades-Bahia-Brasil, pois a erosão do solo descoberto, o lixiviamento de nutrientes e matéria orgânica proveniente das atividades agropecuárias são fatores que contribuem para a degradação da qualidade do corpo hídrico.

O estudo de da Silva e Vargas (2017) analisou fósforo e demanda química de oxigênio (DQO) em amostras de água coletadas em um rio de Guarulhos-SP. Demonstrando que as amostras coletadas apresentam alto teor de matéria orgânica e fósforo, destacando para os teores de fósforo que apresentaram valores de IET (Índice de Estado Trófico) acima de 70, fato este que confirma a presença de esgoto doméstico devido à falta de saneamento básico nas áreas estudadas.

Além disso, Motta Campos Libos et al. (2023) realizaram uma análise espacial de dados de monitoramentos de qualidade de água em Santa Catarina. Os resultados do estudo indicam que a DQO e o fósforo total apresentam um aumento significativo de montante para jusante nos rios Itajaí do Oeste, Itajaí do Norte, Itajaí-Açu e Itajaí do Sul, refletindo a deterioração da qualidade da água devido à poluição pontual e difusa.

Os valores de DQO variaram significativamente ao longo dos pontos de monitoramento, frequentemente ultrapassando os limites estabelecidos pela legislação. O fósforo total também apresentou aumentos acentuados, especialmente em áreas urbanizadas e industrializadas, com vários pontos de monitoramento excedendo os limites permitidos, indicando contaminação causada por atividades antrópicas e agropecuárias. No Rio Itajaí do Sul, houve aumentos consideráveis nesses parâmetros a jusante do primeiro ponto de monitoramento, destacando a influência das atividades humanas (Motta Campos Libos et al., 2023). Esses achados destacam a necessidade de monitoramento contínuo e medidas de controle de poluição para mitigar os impactos das atividades humanas sobre os recursos hídricos.

Tabela 1. Valores médios das análises físico-químicas das amostras de água do Rio Lageado Guamirim.

Parâmetros	Pontos de Coleta								CONAMA N° 357/2005*
	1	2	3	4	5				
					501	502	503	601	
Fósforo Total (mg.L ⁻¹)	0,025	0,050	0,075#	0,100#	0,1500#	0,050	0,450#	0,200#	≤0,050 mg/L, em ambientes intermediários
Demanda Química de Oxigênio (mg.L ⁻¹)	63,5	<40	59,12	196,25	54,28	<40	<40	<40	-

P1: Ponto 1 (nascente); P2: Ponto 2 (região urbana); P3: Ponto 3 (região urbana); P4: Ponto 4 (região rural); P5: Ponto 5 (região rural) na subida (501, 502, 503) e descida (601) do nível do Rio após o evento chuvoso. * Classe 1 e 2 de Água Doce. # Valores maiores que os estabelecidos pela Legislação do CONAMA Nº 357/2005.

E. fetida

Os resultados obtidos através da distribuição dos organismos *E. fetida* expostos às

amostras de água do rio estão plotados na Figura 2 e 3. O experimento pode ser validado, pois os testes com o controle negativo (CO⁻) apresentaram distribuição homogênea entre 40 e 60%. No controle positivo observou-se um comportamento

Santos, V. B., Oliveira, A. K. G., Bressiani, P. A., Berton, G. H., Gomes, E. M. V., Pokrywiecki, J. C., Pokrywiecki, T. S., Dusman, E.

de fuga, com uma distribuição de 80% no solo controle e apenas 20% no solo teste contendo ácido bórico (CO^+), onde o solo teste com a substância de referência deve apresentar valor inferior a 20% do número total de minhocas, de acordo com a NBR ISO 17512-1 (Brasil, 2011).

Os dados mostram que tanto na zona urbana (pontos 1 e 3) como na zona rural (ponto 5) as amostras apresentaram efeito tóxico para as minhocas. Inclusive, os resultados corroboram com o estudo de Schutz et al. (2021) que, avaliando a toxicidade das águas do Rio Chopim pelo teste fuga com minhocas *E. fetida*, também confirmaram a toxicidade para este bioindicador das águas coletadas próximas à uma zona rural. Além disso, semelhante ao observado no presente estudo com o Ponto 1 (nascente do Rio Guamirim), Schutz et al. (2021) também confirmaram a toxicidade da nascente do Rio Chopim avaliado.

Com os resultados obtidos no ponto 5, pode-se observar que o evento chuvoso não interferiu na toxicidade, pois na subida e descida do nível do Rio foi observada toxicidade. No estudo desenvolvido por McIntyre et al. (2015) também foi confirmada a toxicidade para *Ceriodaphnia dubia* do escoamento urbano não tratado de uma rodovia em Seattle, em seis eventos de tempestade. E, Gersberg et al. (2004), verificaram maior toxicidade para *C. dubia* das águas do rio Tijuana nas primeiras 1–2 h do início dos eventos de chuva.

O estudo de Moreira et al., (2022) utilizou diferentes biomarcadores *in vitro* e *in vivo* para avaliar a qualidade da água do Rio Ilha-RS-Brasil. Foi realizado teste de toxicidade crônica em *C. elegans*, onde todas as amostras atrasaram o desenvolvimento de *C. elegans*, caracterizando toxicidade. O fósforo esteve acima do limite estabelecido pela legislação brasileira nos três pontos de amostragem em duas das três coletas, indicando a provável presença de componentes agrícolas na água, corroborando com os resultados deste estudo.

Vários fatores podem contribuir para a toxicidade observada nas amostras de água do Rio Lageado Guamirim. A presença de contaminantes químicos pode ser um dos principais contribuintes. Além disso, eventos de chuva podem desempenhar um papel na mobilização de poluentes para o rio, exacerbando a contaminação e aumentando os riscos para a vida aquática.

Dessa forma, a análise de componentes principais (Figura 4) indicou correlação positiva da taxa de fuga das minhocas *E. fetida* com o teor de fósforo. Estes dados corroboram com os resultados da análise química dessas amostras (Tabela 1), pois o teor de fósforo encontrava-se acima do limite permitido pela legislação para os pontos 3 e 5.

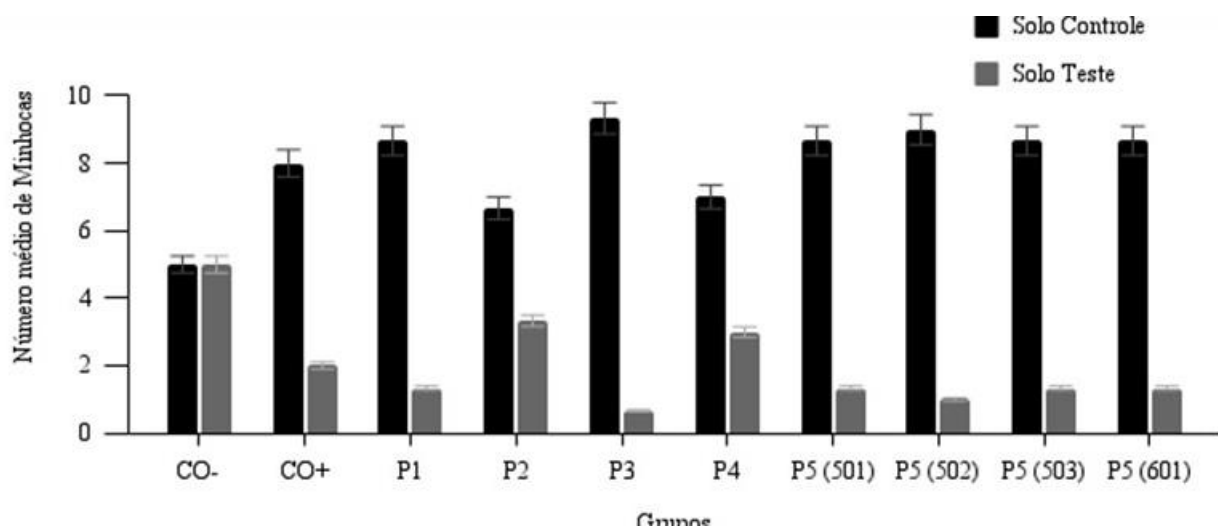


Figura 2. Distribuição dos organismos nos grupos controle e nas amostras de água do Rio Lageado Guamirim. CO⁻: Controle Negativo; CO⁺: Controle Positivo; P1: Ponto 1 (nascente); P2: Ponto 2 (região urbana); P3: Ponto 3 (região urbana); P4: Ponto 4 (região rural); P5: Ponto 5 (região rural) na subida (501, 502, 503) e descida (601) do nível do Rio após o evento chuvoso

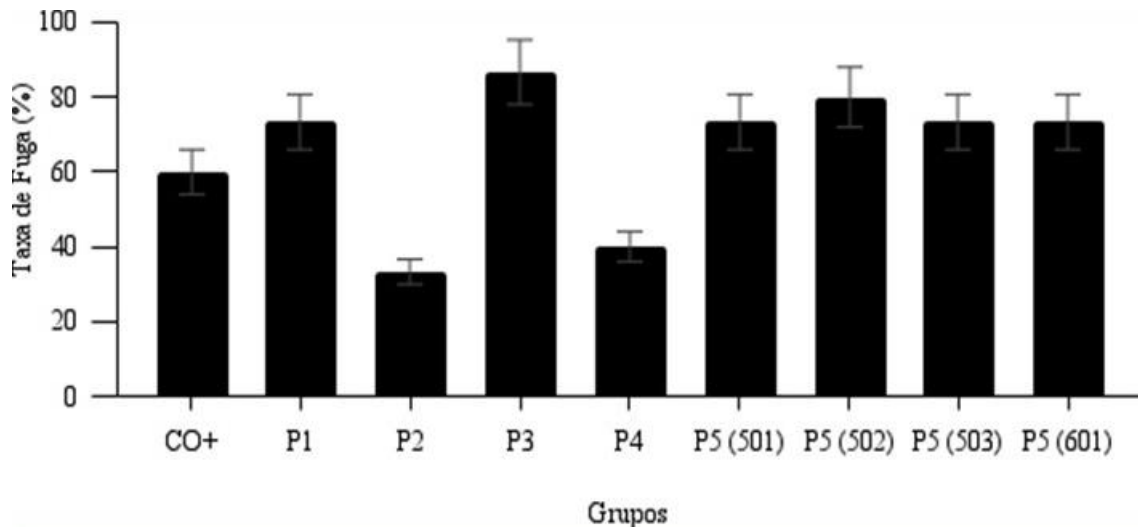


Figura 3. Taxa de fuga dos organismos *E. fetida* expostos ao controle positivo e as amostras de água do Rio Lageado Guamirim. CO⁺: Controle Positivo; P1: Ponto 1 (nascente); P2: Ponto 2 (região urbana); P3: Ponto 3 (região urbana); P4: Ponto 4 (região rural); P5: Ponto 5 (região rural) na subida (501, 502, 503) e descida (601) do nível do Rio após o evento chuvoso.

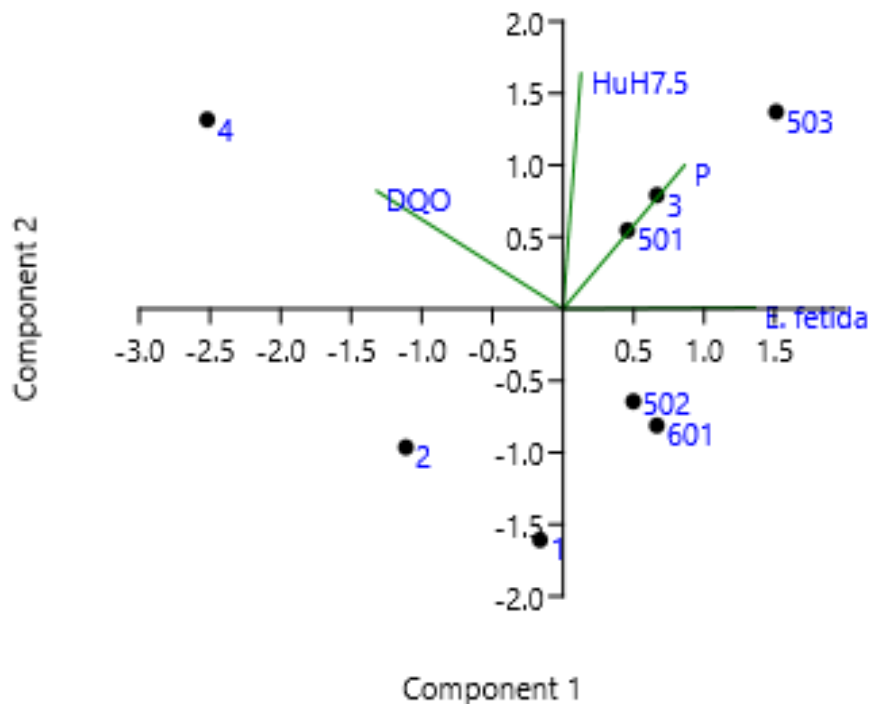


Figura 4. Análise de componentes principais. DQO: Demanda Química de Oxigênio; P: fósforo; P1: Ponto 1 (nascente); P2: Ponto 2 (região urbana); P3: Ponto 3 (região urbana); P4: Ponto 4 (região rural); P5: Ponto 5 (região rural) na subida (501, 502, 503) e descida (601) do nível do Rio após o evento chuvoso. PC1: 40,10% e PC2: 32,57%.

Células HuH7.5

Os dados das viabilidades celulares das diferentes concentrações das amostras do Rio Lageado Guamirim estão representados na Tabela

2. Ao realizar o teste de MTT em células hepáticas (HuH7.5), é visto que as amostras dos pontos 1 e 2 não apresentam nenhuma mudança estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, nos três tempos avaliados, não sendo citotóxicas para o bioindicador utilizado.

Tabela 2. Percentual da viabilidade celular (VC) de células HuH7.5 tratadas com as amostras de água do Rio Lageado Guamirim, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

		HUH7.5		
Grupos	Concentrações	VC[%]		
		24h	48h	72h
CO+	-	21,22	26,30	18,37
CO-	-	100	100	100
1	1:10	91,62	91,64	104,92
	1:100	99,32	89,49	109,09
	1:1000	104,31	92,25	112,88
2	1:10	96,30	119,17	163,26
	1:100	106,12	95,02	104,64
	1:1000	96,75	98,24	106,44
3	1:10	108,19	382,02*	282,10*
	1:100	112,73	104,37	160,98
	1:1000	100,04	99,62	109,85
4	1:10	138,29	290,34*	238,07*
	1:100	139,88	335,66*	289,46*
	1:1000	97,89	98,01	115,40
5	1:10	106,38	83,63	245,64*
	501 1:100	92,67	83,51	148,39
	1:1000	95,51	108,67	91,10
	502 1:10	121,75	123,89	187,37*

	1:100	96,53	90,76	107,77
	1:1000	100,83	94,94	96,72
	1:10	96,30	180,25*	237,31*
503	1:100	100,68	82,98	105,87
	1:1000	90,26	100,84	103,47
	1:10	113,52	162,88*	133,65
601	1:100	97,51	100,61	155,68
	1:1000	94,56	95,94	95,45

CO: Controle Negativo; CO⁺: Controle Positivo; P1: Ponto 1 (nascente); P2: Ponto 2 (região urbana); P3: Ponto 3 (região urbana); P4: Ponto 4 (região rural); P5: Ponto 5 (região rural) na subida (501, 502, 503) e descida (601) do nível do Rio após o evento chuvoso. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnett, $p < 0,05$).

Entretanto, as amostras dos pontos 3 [1:10] (tempos de 48 e 72 horas), 4 [1:10] e [1:100] (tempos de 48 e 72 horas), 5 na subida (501 ([1:10] tempo 72 horas), 502 ([1:10] tempo 72 horas) e 503 ([1:10] tempos de 48 e 72 horas)) e na descida da água (601 ([1:10] tempo 48 horas)), apresentaram um aumento estatisticamente significativo das absorvâncias médias se comparadas ao controle negativo.

Esses resultados mostram que essas amostras de água podem ter induzido um aumento da divisão celular da linhagem hepática ou ainda um aumento da atividade mitocondrial da mesma, em resposta aos componentes tóxicos presentes nestas águas. Inclusive, observando os dados das viabilidades celulares (Tabela 2) nota-se que os valores foram acima de 100% para estas amostras. Inclusive, a análise de componentes principais (Figura 4) indicou correlação positiva do teste do MTT com as células HuH7.5 com o teor de fósforo e a demanda química de oxigênio. Os pontos 3, 4 e 5 foram os que apresentaram valores de fósforo acima do limite da legislação e, o ponto 4 o maior teor de DQO dentro todos os pontos avaliados.

Estes resultados corroboram com o estudo de Moreira et al. (2022), que avaliaram a citotoxicidade das águas do Rio Ilha-RS-Brasil em três pontos (próximo à nascente, trecho intermediário e foz) em células fibroblastos pulmonares de hamster (V79), também pelo teste Santos, V. B., Oliveira, A. K. G., Bressiani, P. A., Berton, G. H., Gomes, E. M. V., Pokrywiecki, J. C., Pokrywiecki, T. S., Dusman, E.

do MTT. Os autores observaram que os todos pontos apresentaram um aumento da atividade mitocondrial, sendo semelhantes entre si, assim como no presente estudo.

É válido ressaltar que nenhuma das amostras que apresentaram citotoxicidade induziu aumento estatisticamente significativo da divisão celular no menor tempo de avaliação (24 horas), apenas nos tempos de 48 e/ou 72 horas e, principalmente, na maior concentração ([1:10]), demonstrando que o aumento do tempo em contato com as amostras e a dose têm correlação com a citotoxicidade.

Os resultados do estudo de Lin et al. (2022) destacam os efeitos citotóxicos dos sedimentos do rio Ke-Ya em diferentes linhagens de células humanas, com a amostra a jusante (zona de acumulação) demonstrando maior citotoxicidade em comparação com as zonas intermediária (zona de águas residuais domésticas/industriais) e montante (zona não desenvolvida). A diminuição significativa da viabilidade celular, como indicado pelo ensaio do MTT, sugere danos celulares induzidos pelos componentes tóxicos presentes nessas amostras. Além disso, o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em todas as linhas celulares testadas indica um estresse oxidativo induzido pela exposição aos sedimentos.

Com relação ao efeito da chuva, assim como o observado para o teste de ecotoxicidade

com as minhocas, pode-se observar que tanto na subida como na descida do rio observou-se alterações nas divisões celulares das células hepáticas humanas do presente estudo.

Os efeitos do consumo de água contaminada podem ser muito danosos ou até mesmo letais para os humanos e o ecossistema onde se encontram (Atsdr, 2019). Os efeitos que podem ser causados pelo consumo da água contaminada são danos no fígado e sistema nervoso central (Fernandes Neto e Sarcinelli, 2009), podendo chegar ao hepatocarcinoma, um câncer agressivo que atinge cerca de 80% dos casos de tumores que tiveram início no fígado (Inca, 2022).

Estes resultados corroboram com o presente estudo ao evidenciar os efeitos adversos da contaminação dos corpos hídricos em organismos vivos, neste caso, células humanas. Os estudos citados apontam para uma associação entre a presença de contaminantes na água do rio e respostas citotóxicas, demonstrando a importância de avaliar a qualidade da água não apenas por parâmetros físico-químicos, mas também por meio de testes biológicos.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências claras dos efeitos adversos da contaminação da água do Rio Lageado Guamarim em organismos vivos, incluindo minhocas *E. fetida* e células hepáticas humanas (HuH7.5). A análise físico-química das amostras revelou a presença de contaminantes, como fósforo e demanda química de oxigênio, em concentrações acima dos limites permitidos pela legislação ambiental em vários pontos de coleta, indicando uma possível origem antrópica da poluição. O que pode justificar a toxicidade desses pontos, visto que, em excesso, esses nutrientes são prejudiciais ao meio aquático.

Os testes de toxicidade com minhocas *E. fetida* demonstraram efeitos adversos significativos das amostras de água do rio, tanto em áreas urbanas quanto rurais (1, 3 e 5 - subida e descida do nível do rio) ou seja, os demais pontos (pontos 2 e 4) não apresentaram efeito tóxico ao bioindicador. A correlação entre os resultados deste estudo e estudos anteriores destaca a persistência da contaminação e seus efeitos prejudiciais em diferentes contextos ambientais.

Os ensaios com células HuH7.5 revelaram aumentos estatisticamente significativos na atividade mitocondrial e divisão celular em

resposta às amostras de água, especialmente nos pontos 3, 4 e 5 na subida e descida do nível do rio. A correlação positiva entre a viabilidade celular e os teores de fósforo e DQO indica uma possível associação entre esses contaminantes e os efeitos observados nas células hepáticas humanas.

Os resultados mostraram que as amostras de água do rio apresentaram efeitos tóxicos para ambos os bioindicadores, nos pontos 3 e 5, que correspondem às zonas urbana e rural. A utilização de diferentes bioindicadores é essencial para identificar os efeitos de poluentes no ambiente e a sensibilidade entre as espécies e diferentes níveis tróficos. Sugere-se um monitoramento constante das águas desta bacia hidrográfica, a fim de identificar as fontes poluidoras e causadoras de toxicidade para evitar maiores danos à biodiversidade aquática e à saúde humana. Em suma, este estudo reforça a importância de monitorar e avaliar continuamente a qualidade da água dos rios, utilizando uma variedade de abordagens biológicas e físico-químicas. A compreensão abrangente dos impactos da contaminação da água é essencial para a implementação eficaz de políticas de gestão ambiental e a proteção da saúde humana e do meio ambiente.

Agradecimentos

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa Produtividade da Prof^a. Dr^a. Elisângela Düsmann (CNPq#305029/2022-3).

Referências

- Apha, (2012). 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
- Atsdr, (2019). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profiles. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>.
- Assumpção, R. M. V., & Morita, T. (1968). Manual de Soluções e Reagentes e Solventes, Ed. Edgard Blucher e Ed. da USP.
- Bianchi, E., Dalzochio, T., Simões, L. A. R., Rodrigues, G. Z. P., da Silva, C. E. M., Gehlen, G., ... Nascimento, C. A., Spilki, F.R., Luiza Ziulkoski, A.L., da Silva, L. B. (2019). Water quality monitoring of the Sinos River Basin,

Santos, V. B., Oliveira, A. K. G., Bressiani, P. A., Berton, G. H., Gomes, E. M. V., Pokrywiecki, J. C., Pokrywiecki, T. S., Dusman, E.

- Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 19(3), 328-338. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.05.002>.
- Brasil, (2011). ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 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*). NBR ISO 17512-1. ABNT: Rio de Janeiro.
- Brasil, (2005). Conama – Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Classificação das águas doces, salobras e salinas do território Nacional. Resolução n.357.
- Cemaden, (2021). Mapa Interativo. São Miguel do Oeste - SC, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/cemaden/pt-br>.
- Cesar, R. G., Marçal, M. dos S., Serrano, A. F., Lourenco, R. S., Teixeira, M., Vezzoni, M., ... Castilhos, Z. C. (2022). Poluição por metais pesados em depósitos fluviais impactados pelo rompimento de barragem de mineração na Bacia do Rio Doce (MG): minhocas como bioindicadores. *Revista Brasileira De Geografia Física*, 15(1), 414-428. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v15.1.p414-428>.
- Chislock, M. F., Doster, E., Zitomer, R. A., Wilson, A. E. (2013). Eutrophication: causes, consequences, and controls in aquatic ecosystems. *Nature Education Knowledge*, 4(4), 10.
- Chen, F., Zhang, Q., Zheng, G., Shen, X., Xue, Z., Zhang, M., ... & Wang, Y. (2024). Enhancing bioretention efficiency for pollutant mitigation in stormwater runoff: Exploring ecosystem cycling dynamics amidst temporal variability. *Bioresource Technology*, 402, 130827. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130827>.
- Collaço, M. (2003). Caracterização Regional do Município de São Miguel Do Oeste. Secretaria de Estado do Planejamento, Orçamento e Gestão de Santa Catarina. São Miguel do Oeste, [s.n.]. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/diagnostico/S_MIGUEL_DO_OES TE.pdf, 2003
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., Espindola, E. L. G. (2008). Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820-1830. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.
- Cotta, J. A. de O., Lemos, G. S., Lima, E. N. (2020). Ecotoxicological tests of diesel contaminated soil subjected to degradation by *Eisenia fetida*. *Research, Society and Development*, 9(2), e106922122. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i2.2122>.
- da Silva, M. A., & Vargas, R. R. (2017). Análise de fósforo e DQO em amostras de águas naturais no município de Guarulhos. *Revista Educação - UNG-Ser*, 11(3 ESP), 81. Recuperado de <https://revistas.ung.br/educacao/article/view/2524>.
- Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Pérez-Vázquez, F. J., González-Mille, D. J., Flores-Ramírez, R., del Carmen Cuevas-Díaz, M., ... & Ilizaliturri-Hernández, C. A. (2019). DNA damage in earthworms by exposure of Persistent Organic Pollutants in the low basin of Coatzacoalcos River, Mexico. *Science of the total environment*, 651, 1236-1242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.207>.
- Fenech, M. (2000). A técnica de micronúcleos *in vitro*, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).
- Fernandes Neto, M. L., Sarcinelli, P. N. (2009). Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição no processo de atualização da legislação brasileira, *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 14(1), 69-78. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522009000100008>.
- Gersberg, R. M., Daft, D., Yorkey, D. (2004). Temporal pattern of toxicity in runoff from the Tijuana River Watershed. *Water Research*, 389(3), 559-568. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.11.002>.
- Gupta, R. C. (2019). Biomarkers in toxicology. Academic Press, Ed. 2, Chapter 1: Introduction, 3-5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814655-2.00001-3>.
- Huang, S., Gan, Y., Chen, N., Wang, C., Zhang, X., Li, C., & Horton, D.E. (2024). Urbanization enhances channel and surface runoff: A quantitative analysis using both physical and empirical models over the Yangtze River basin. *Journal of Hydrology*, 635, 131194. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2024.131194>.
- Iliopoulou-Georgoudaki, J., Kantzaris, V., Katharios, P., Kaspiris, P., Georgiadis, T., &

- Montesantou, B. (2003). An application of different bioindicators for assessing water quality: a case study in the rivers Alfeios and Pineios (Peloponnisos, Greece). *Ecological indicators*, 2(4), 345-360. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-160X\(03\)00004-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-160X(03)00004-9).
- Inca, (2022). Tipos de câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>.
- Khanal, R., Furumai, H., Nakajima, F., Yoshimura, C. (2019). Impact of holding time on toxicity change of urban road dust during runoff process. *Science of The Total Environment*, 668, 1267-1276. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.088>.
- Lin, M. W., Huang, H. L., Yu, X. R., Lin, Y. X., Li, X. A., Tsui, L., ... & Chou, H. C. (2022). Urban sediment pollutants alternate human cell essential behaviour through promoting oxidative damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113065. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113065>.
- Lin, M. W., Chen, J. Y., Ye, Y. X., Chen, W. Y., Chan, H. L., & Chou, H. C. (2024). Genotoxicity and cytotoxicity in male reproductive cells caused by sediment pollutants. *Science of The Total Environment*, 173578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173578>.
- Liu, W., Wu, J., Xu, F., Mu, D., & Zhang, P. (2024). Modeling the effects of land use/land cover changes on river runoff using SWAT models: A case study of the Danjiang River source area, China. *Environmental Research*, 242, 117810. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117810>.
- Marcolin, M. O. S. C., Quinelato, R. V., Okumura, A. T. R., da Silva, A. G., de Ferreira Bandeira, M. L. S. (2020). Avaliação da Qualidade da Água em Microbacias Hidrográficas do Extremo Sul da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 13(05), 24447-2461. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v13.5.p2447-2461>.
- Maziero, C., Tomazoni, J. C. (2016). Estudo da Gestão e do Uso e Ocupação das Margens do Rio Guamirim no Perímetro Urbano de São Miguel do Oeste – SC (Study of management and use and occupation of the margins of Guamirim River in the urban perimeter of São Miguel do Oeste – SC). *Revista Brasileira de Geografia Física*, 9(5), 1486-1500. <https://doi.org/10.5935/1984-2295.20160101>.
- McIntyre, J. K., Davis, J. W., Hinman, C., Macneale, K. H., Anulacion, B. F., Scholz, N. L., Stark, J. D. (2015). Soil bioretention protects juvenile salmon and their prey from the toxic impacts of urban stormwater runoff. *Chemosphere*, 132, 213-219. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.052>.
- Moreira, M. G., Rodrigues, G. Z. P., Garcia, A. L. H., de Jesus Borba, D., Scheffer, M. G. B., da Silva, L. C., Peteffi, G. P., Linden, R., Charão, M. F., Gehlen G., Perassolo, M. S., Ziulkoski, A. L. (2022). Association of different biomarkers in vivo and in vitro to assess water quality in Ilha River, Southern Brazil. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 22(4), 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2022.07.005>.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Motta Campos Libos, N., Pinheiro, A., & Girardi, R. (2023). Análise Espacial de Dados de Monitoramentos de Qualidade de Água em Santa Catarina. *Revista Brasileira De Geografia Física*, 16(2), 672-687. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v16.2.p672-687>.
- Musoke, D., Ndejjo, R., Halage, A. A., Kasasa, S., Ssempebwa, J. C., Carpenter, D. O. (2018). Drinking water supply, sanitation, and hygiene promotion interventions in two slum communities in Central Uganda. *Journal Of Environmental And Public Health*. (1), 3710120. <https://doi.org/10.1155/2018/3710120>.
- Nunes, B. S., Rodrigues, S., Antunes, S. C., Castro, B. B., Gonçalves, F. (2011). The use of biomarkers to assess aquatic pollution by widespread agents (detergents–SDS; pesticides–chlorfenvinphos): feasibility, responsiveness and biological consequences in fish. *Toxicology Letters*, 205, 6. DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.05.256.
- Oecd, (1984). Organization for Economic Co-Operation and Development. Earthworm acute toxicity test. Paris, 9. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

- Okumura, A. T. R., Silva, A. G., Silva, N. R. S., Lopes, E. R. N., Bifano, R. B. A., Quilenato, R. V. (2020). Determinação da qualidade da água de um rio tropical sob a perspectiva do uso. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 13(4), 1835-1850.
<https://doi.org/10.26848/rbgf.v13.4.p1835-1850>.
- Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P., Rossi, C. (2006). A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic Toxicology*, 77(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.010>.
- Santos, D. da S., Cesar, R. G., Polivanov, H., Lourenço, R. S., Koifman, G., & Fernandes, Y. R. de A. (2022). Salinização de solos em cenário de aumento do nível do mar na Baixada de Jacarepaguá (Rio De Janeiro, RJ): toxicidade para minhocas. *Revista Brasileira De Geografia Física*, 15(5), 2260-2278.
<https://doi.org/10.26848/rbgf.v15.5.p2260-2278>.
- São Miguel Do Oeste, (2009). Diagnóstico do Plano Diretor Municipal São Miguel do Oeste, de 10 de novembro. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/plano-diretor-sao-miguel-do-oeste-sc>.
- Schutz, D. L., Marco, I. G., Alves, G. L., Vincoski, J. V. A., Ishikawa, S., Schmitz, A. P. O., Gomes, E. M. V., Manosso, F. C., Tonial, I. B., Pokrywiecki, J. C. (2021). Biomonitoring of surface water quality in the Chopim River within the Conservation Unit Campos de Palmas Wildlife Refuge, southern Brazil. *Environmental Monitoring And Assessment*, 193(11), 1-18.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10661-021-09464-6>.
- Shao, F., Wu, J., Tao, W., Wang, Q., & Li, Y. (2022). Efficacy of earthworm casts on sediment and nitrate loss with runoff in the Chinese Loess Plateau. *Soil and Tillage Research*, 219, 105328.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105328>.
- Shao, F., Tao, W., Wu, J., Lin, S., & Wang, Q. (2023). Combined effects of the earthworm casts application and fallow time on runoff and sediment loss by raindrop splashing in the Loess Plateau, China. *Journal of Environmental Management*, 325, 116472.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116472>.
- Shi, Z., Du, Y., Liu, H., Deng, Y., Gan, Y., & Xie, X. (2025). Molecular characteristics of dissolved organic phosphorus in watershed runoff: Coupled influences of land use and precipitation. *Journal of Environmental Sciences*, 148, 387-398.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2024.01.022>.
- Sun, J., Zhu, Y., Yin, H., & Yin, J. (2024). The release of polypropylene plastic from disposable face masks in different water conditions and their potential toxicity in human cells. *Environmental Pollution*, 343, 123296.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123296>.
- Trintinaglia, L., Bianchi, E., Silva, L. B., Nascimento, C. A., Spilki, F. R., Ziulkoski, A. L. (2015). Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. *Brazilian Journal of Biology*, 75(2), 75-80. DOI: 10.1590/1519-6984.0113.
- Wen, S., Wang, J., Li, Y., & Shao, M. A. (2022). Effects of anecic earthworms on runoff and erosion on the slope with soil from the Loess Plateau under a rainfall simulation experiment. *Agricultural Water Management*, 259, 107230.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107230>.
- Wen, S., Wang, J., Li, Y., & Liu, Y. R. (2023). Earthworms reduce nutrient loss from loess soil slopes under simulated rain. *Geoderma*, 438, 116654.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116654>.
- Wang, Y., Xu, H., Zhao, X., Kang, L., Qiu, Y., Paerl, H., Zhu, G., Li, H., Zhu, M., Qin, B., Zhang, Y., & Liu, M. (2025). Rainfall impacts on nonpoint nitrogen and phosphorus dynamics in an agricultural river in subtropical montane reservoir region of southeast China. *Journal of Environmental Sciences*, 149, 551-563.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2024.02.012>.
- Zhang, W., Ye, Y., Tong, Y., Ou, L., Hu, D., & Wang, X. (2011). Modeling time-dependent toxicity to aquatic organisms from pulsed exposure of PAHs in urban road runoff. *Environmental Pollution*, 159(2), 503-508.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.008>.
- Zorn, M. I., Van Gestel, C. A. M., Morrien, E., Wagenaar, M., & Eijssackers, H. (2008). Flooding responses of three earthworm species, *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus rubellus*, in a laboratory-controlled environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 587-593.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.028>.