

RELATÓRIO DE PÓS-DOCTORADO FINAL

Flávia Yoshie Yamamoto

**Avaliação da toxicidade dos poluentes presentes no Rio Doce após rompimento da
barragem do Fundão (MG) através de diferentes biomarcadores em peixes**

Relatório de Pós-doutorado realizado pela
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências do
Campus do Litoral Paulista - São Vicente

Supervisor: Denis Moledo de Souza Abessa
Supervisor BEPE: Romà Tauler (IDAEA – CSIC)

Agência de fomento – FAPESP -Número do Processo: 2016/15229-1
Período de vigência: 01/09/2018 a 27/01/2023

São Vicente, 2023

EQUIPE COLABORADORA DA PESQUISA

Coleta e identificação das espécies de peixes do Rio Doce¹

- Tiago Cesarim Pessali – Museu de Ciências Naturais da PUC Minas (MG)

Análises químicas

- Msc. Guacira Eufrásio – UNESP CLP (NEPEA)
- Prof. Rubens Cesar Lopes Figueira – USP (Instituto Oceanográfico)
- Msc. Mayara Padovan dos Santos – UFPR (Grupo de Química Ambiental)
- Prof. Marco Tadeu Grassi - UFPR (Grupo de Química Ambiental)
- Dra. Gabrielle Melo Fernandes– UFC (Instituto de Ciências do Mar)
- Msc. Lorena Sampaio Nascimento– UFC (Instituto de Ciências do Mar)
- Prof. Rivelino Martins Cavalcante – UFC (Instituto de Ciências do Mar)

Análises bioquímicas

- Kaori Onishi – UNESP CLP (NEPEA)
- Isabella Beverari – UNESP CLP (NEPEA)
- Thaisa Ralha Rodrigues – UNESP CLP (NEPEA)

Análises Histológicas

- Msc. Cláudia Neves Correa – UNESP CLP (Laboratório de Morfologia Animal)
- Kaori Onishi – UNESP CLP (NEPEA)
- Msc. Gabriela P. Marinsek – UNESP CLP (Laboratório de Morfologia Animal)
- Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro – UFPR (Laboratório de Toxicologia Celular)
- Prof. Cláudia Feijó Ortolani-Machado – UFPR (Laboratório de Toxicologia Celular)
- Msc. Larissa A. Batista – UFPR (Laboratório de Reprodução e Comunidade de Peixes)
- Prof. Dr. Luís F. Fávaro – UFPR (Laboratório de Reprodução e Comunidade de Peixes)

Análises Moleculares

- Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro – UFPR (Laboratório de Toxicologia Celular)
- Prof. Katherine M. Spencoski – UFPR (Laboratório de Fisiologia da Reprodução)

Análises de genotoxicidade

- Dra. Laís Fernanda Oya Silva – UFPR (Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental)

Análises de embriotoxicidade

- Prof. Juan Ramon Esquivel Garcia – Unisul e piscicultura Panamá
- Msc Vinicius C. S. de Paula – UTFPR (Laboratório de Ecotoxicologia UTFPR)
- Msc. Angie Thaisa Costa Souza – UFPR (Modelagem Matemática)

Análises Estatísticas Multivariadas, Análise Quimiométrica e Metabolômica

- Prof. André Andian Padial UFPR (Departamento de Ecologia e Conservação)
- Prof. Roma F. Tauler – IDAEA (Barcelona, Espanha)
- Profa. Silvia Lacorte Bruguera – IDAEA (Barcelona, Espanha)
- Dra. Carmen Bedia Gírbés – IDAEA (Barcelona, Espanha)
- Dra. Ana López Antia – IDAEA (Barcelona, Espanha)
- Msc. Carlos Pérez-López– IDAEA (Barcelona, Espanha)

¹ Participação nas coletas: Matheus Mascarin, Gabriel.M. Alves, Guilherme.F. Guerra, Beatriz. Moreno, Giam.L. Altafim, Ana.M. Schafaschek, Kaori Onishi, José.F.S. Abreu (APARD Association)

RESUMO DO PROJETO INICIAL

Durante várias décadas as atividades de mineração no Brasil, particularmente na Região do Quadrilátero Ferrífero, são responsáveis por causar impacto ambiental com a geração de resíduos de minérios que acabam sendo destinados aos corpos hídricos. Com o desastre ambiental do rompimento da barragem do Fundão (MG) milhões de litros de rejeitos de minérios de ferro foram mobilizados à bacia do Rio Doce, gerando um grande prejuízo socioeconômico e ambiental. Análises químicas na água já detectaram ao longo do percurso do rio elevadas concentrações de elementos como Fe, Al, Mn, e os de maior potencial tóxico como As, Cd e Pb após o acidente. Porém, ainda restam ser investigadas a presença e a distribuição destes poluentes, bem como a possível ocorrência de contaminantes orgânicos, em diferentes compartimentos ambientais, como o sedimento e os organismos expostos. Além disso, são necessárias outras análises que considerem os efeitos toxicológicos causados nos organismos expostos a curto, médio e longo prazo. Desta forma, os reais danos socioambientais causados devem ser avaliados adequadamente através de diversas abordagens que investiguem tanto os aspectos abióticos como os bióticos deste ecossistema. Este projeto tem como objetivo avaliar a qualidade ambiental após o acidente, por meio da detecção e quantificação dos poluentes (metais e compostos orgânicos) presentes nos compartimentos abióticos (água e sedimento) e bióticos (tecidos dos peixes), associados às diferentes respostas biológicas desencadeadas nos peixes nativos da bacia do Rio Doce, modelos animais adequados para este estudo, em fase adulta para: i) avaliar a saúde geral dos peixes em diferentes locais e períodos de coleta; ii) verificar os principais mecanismos de defesa e de adaptação ativados nos peixes, após exposição aguda aos compostos tóxicos; iii) avaliar possíveis alterações nos processos reprodutivos dos peixes; e nas fases iniciais do desenvolvimento: iv) verificar a embriotoxicidade e v) desenvolver um modelo matemático que permita prever os efeitos em níveis populacionais a longo prazo. Com estes resultados será possível avaliar de forma mais adequada os efeitos adversos causados na ictiofauna deste ambiente impactado para auxiliar nas tomadas de decisões das autoridades públicas.

INTRODUÇÃO

Este Relatório Científico Final contempla todas as atividades desenvolvidas durante todo o período de vigência da bolsa (01/09/2018 a 27/01/2023), incluindo o BEPE, sendo apresentadas as informações referentes aos Relatórios Parciais I e II (01/09/2018 a 31/07/2021), já avaliados pela Assessoria Científica da FAPESP, juntamente com as atividades realizadas no último período (01/08/2021 a 27/01/2023).

Inicialmente, todas as atividades realizadas foram listadas resumidamente, sendo posteriormente descritas em maiores detalhes nos seus respectivos anexos. Também são fornecidos esquemas metodológicos de todas as análises realizadas durante o pós-doutorado para suas respectivas publicações concluídas ou em andamento, a fim de facilitar a compreensão dos trabalhos desenvolvidos.

As atividades foram apresentadas conforme a seguinte ordem:

1. Listagem das atividades realizadas em **todo o Período do pós-doutorado** (pág. 5-12), incluindo palestras e participações em eventos científicos, orientações/coorientações de alunos, revisões de artigos e participação de bancas, e a listagem das publicações;
2. Esquemas metodológicos representativos de todas as análises realizadas durante o pós-doutorado, referentes a cada publicação (concluídas ou em andamento, pág. 13), e a conclusão das atividades desenvolvidas durante o pós-doutorado;
3. **ANEXO I** – Informações detalhadas referentes aos Relatórios Parciais I e II;
4. **ANEXO II** - Publicações resultantes do auxílio da FAPESP, referentes a todos os períodos;
5. **ANEXO III** – Relatório da BEPE e das atividades do Plano de transferência do conhecimento adquirido no exterior.

Realizações durante todo o período do pós-doutorado

(01/09/2018 a 27/09/2023):

Palestras em eventos científicos²

Data	Evento	Trabalho apresentado/publicado	Agradeciment o FAPESP
11/2020	III Simpósio de Zoologia de Vertebrados Neotropicais	<i>Efeitos tóxicos sobre a ictiofauna associados à contaminação por rejeitos da barragem do fundão no rio doce</i>	SIM
08/2020	I SEMANA DA BIOLOGIA UNINTER	<i>Estudo da poluição das águas em bacias hidrográficas brasileiras</i>	SIM
	Disciplina Desastres ambientais: a utilização de organismos como ferramenta de avaliação (UNISANTA)	<i>Efeitos tóxicos sobre a ictiofauna associados à contaminação por rejeitos da barragem do fundão no rio doce</i>	SIM
11/2021	XVII Semana de Biologia Marinha e do Gerenciamento Costeiro	<i>Avaliação da toxicidade dos poluentes presentes no Rio Doce após rompimento da barragem do Fundão (MG) através de diferentes biomarcadores em peixes</i>	SIM
02/2022	IDAEA Weekly Seminars	<i>Exploring chemical and biological data to understand the impacts of the pollutants in the Doce River, Brazil, after the mining dam collapse</i>	SIM
11-13/04/2023*	72ª Reunião Ordinária da CT-Bio - Belo Horizonte/MG.	<i>Avaliação da toxicidade dos poluentes presentes no Rio Doce após rompimento da barragem do Fundão (MG) através de diferentes biomarcadores em peixes (oral)</i>	SIM

* Evento futuro, convite para apresentação no ANEXO 1

Participação em eventos científicos²

Data	Evento	Trabalho apresentado/publicado	Reserva Técnica FAPESP
09/2018	XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (Aracaju, SE) - NACIONAL	<i>Avaliação de efeitos transgeracionais de triclosan e triclocarban em concentrações ambientais para D. magna; Avaliação da ecotoxicidade crônica dos fotoprotetores</i>	NÃO

² Cópias dos certificados no ANEXO II

		<i>octocrileno e 2-etilhexil-4-metoxicinamato em Daphnia magna</i>	
10/2018	Workshop - Sustainable Water Management in Mining and Post-Mining (Belo Horizonte, MG) [#] - INTERNACIONAL	<i>Policy paper: A new vision of sustainable management in mining and post-mining landscapes</i>	NÃO
Data	Evento	Trabalho apresentado/publicado	RT
11/2018	Workshop – Dia D do Rio Doce (Ouro Preto, MG) - NACIONAL		NÃO
06/2019	Fundao Dam Science Meeting (SETAC) - INTERNACIONAL (Brasília, DF)	<i>Deformities in fish embryos exposed to the elutriate from the Doce River during initial stages of development</i>	SIM
16-19/09/2021	XVI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - NACIONAL (ECOTOX, Online)	<i>Combination of multiple chronic contamination sources and a major environmental disaster explain the levels of hazardous inorganic and organic chemicals in the Doce River (Minas Gerais, Brazil)</i>	SIM
26-29/09/2021	Setac Latin America 14 th Biennial Meeting (Valdivia, Chile/ Online) - INTERNACIONAL	<i>Earlier biomarkers in fish evidencing stress responses and tolerance to metal and organic pollution along the Doce River Basin</i>	SIM
29/11-02/12/2021	9 th Ibero-American Congress on Contamination and Environmental Toxicology (Blumenau, SC/ Online) - INTERNACIONAL	<i>From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River</i>	SIM
15-19/05/2022	SETAC Europe 32nd Annual Meeting (Copenhagen, DE) - INTERNACIONAL	<i>Exploring chemical and biological data to understand the impacts of the pollutants in the Doce river, Brazil, after the mining dam collapse (Poster)</i>	SIM
10-11/10/2022	18th Annual Workshop On Emerging High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) And LC-MS/MS Applications In Environmental Analysis And Food Safety (Barcelona, ES) - INTERNACIONAL	<i>LC-HRMS-based metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental chemicals from Doce River in brazilian fish embryos (Poster)</i>	NÃO

[#] Evento financiado pela Academia Brasileira de Ciências, concedido aos pesquisadores selecionados pela Instituição, com a publicação de um *Science Policy Report*.

Orientações concluídas:

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Thaisa Ralha Rodrigues. Avaliação dos danos em macromoléculas dos peixes do Rio Doce através de biomarcadores bioquímicos. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientador: Flávia Yoshie Yamamoto.

Co-orientações concluídas:

Trabalho de conclusão de curso de graduação

2. Kaori Onishi. Avaliação da hepatotoxicidade dos poluentes do rio doce através das análises histopatológicas no fígado dos peixes. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientador: Denis M.S. Abessa

Dissertação de mestrado

1. Monike Felipe Gomes. Avaliação da ecotoxicidade, genotoxicidade e de biomarcadores bioquímicos do Triclosan antes e após fotólise (2017-2019). Dissertação (Mestrado profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Coorientador).

2. Vinicius de Carvalho Soares de Paula. Avaliação da ecotoxicidade e genotoxicidade de filtros UV em microcrustáceos dulcícolas e marinhos. (2017-2019). Dissertação (Mestrado profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. (Coorientador).

Tese de doutorado

Tobias Pereira de Moraes. Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos do reservatório de Salto Segredo/Rio Iguaçu/PR. Início: 2018. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, Companhia Paranaense de Energia. (Coorientador).

Co-orientações em andamento:

Tese de doutorado

1. Larissa Ajala Batista. Avaliação da bioacumulação de contaminantes ambientais e da desregulação endócrina em peixes do Rio Doce após o rompimento da barragem do Fundão, Minas Gerais. Início: 2020. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Coorientador).
2. Ana Marta Schafaschek. Exposição de imaturos de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) a substrato de rejeito de mineração. Início: 2019. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (Coorientador).

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Mestrado

1. Participação em banca de Hilda Vanessa Poquioma Hernandez. Biochemical effects of 2,4-D in animals: A Meta-analytic review and an in vivo study through trophic route. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
2. Participação em banca de Natana Raquel Zuanazzi. Toxicity of 2,4-D herbicide: scientometric review and cronic bioassay in *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). 2020. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
3. Participação em banca de Qualificação (Mestrado em Biotecnologia)
Aluna: Marina Wust Vasconcelos
Título: Análise da Toxicidade Aguda e Subcrônica do Efluente Têxtil, 2020. - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
4. Participação em banca de Marina Wust Vasconcelos.
Título: *Textile effluent toxicity: a scientometric review and bioassay on bioindicators*, 2021. Mestrado em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Revisor de periódico

Data	Periódico
09/2018	Scientific Reports
02/2020	Marine and Freshwater Research
02/2020	Regional Studies in Marine Science
08/2020	Environmental Research
05/2021	Journal of Environmental Science and Health, Part A
01/2021	Environmental Science and Pollution Research
05/2022	Aquatic toxicology
08/2022	Science of the Total Environment
02/2023	Integrated Environmental Assessment and Management (Online)

Lista de Publicações³

As atividades realizadas e os resultados obtidos durante todo o período do pós-doutorado possibilitarão a publicação de pelo menos **8 artigos** de primeira autoria, resultantes do auxílio da FAPESP. Referentes às realizações do último período, foram publicados 3 artigos em revistas indexadas (Elsevier), sendo 2 de acesso aberto. Outro artigo (4º) se encontra no processo de ressubmissão após modificações (“major review”) solicitadas pelo editor. Um último artigo (5º) das atividades desenvolvidas no país encontra-se em fase de elaboração, com todas as análises concluídas. Com relação aos trabalhos realizados no exterior, dois artigos (6º e 7º) se encontram em fase final de elaboração (um deles com uma rodada de revisão do supervisor concluída) e um último (8º) em fase inicial de elaboração, mas também com as análises concluídas.

Presume-se que ao menos 4 outras publicações em coautoria diretamente relacionadas a este trabalho serão obtidas brevemente (1 já aceito, outras 3 em fase inicial de elaboração com as análises concluídas). Mesmo não resultantes do auxílio da FAPESP, outras 5 publicações em coautoria, com o reconhecimento da bolsa da FAPESP, foram obtidas desde o início da vigência da bolsa.

³ Cópias dos trabalhos publicados nos ANEXOS II (apenas as primeiras páginas dos trabalhos como co-autora), III (trabalhos completos publicados, primeira autoria) e IV (trabalho completo submetido, primeira autoria)

Por fim, não menos relevante, destaca-se a oportunidade de extensão do conhecimento adquirido através da apresentação dos resultados obtidos, entre os dias 12 e 13 de Abril de 2023, para a Câmara técnica de Biodiversidade (CT-Bio), parte integrante do Comitê Interfederativo presidido pelo Ibama e representantes da União, a qual objetiva avaliar os estudos dos impactos provocados pelo rompimento da barragem do Fundão. Após a apresentação em Belo Horizonte, será realizada uma outra apresentação para os pescadores do Rio Doce, no município de Rio Doce, a convite do pescador Marcinho, integrante do CT-Bio.

- Primeira autoria

Artigos publicados resultantes do auxílio da FAPESP

1. *From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. **Science of the Total Environment** 846, 157332, 2022.*
Yamamoto, Flávia Yoshie, Souza, A.T.C., Paula, V. de C.S. de, Beverari, I., Garcia, J.R.E., Padial, A.A., de Souza Abessa, D.M.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>
2. *Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster. **Data in Brief** 45, 108715, 2022.*
Yamamoto, F.Y., Pauly, G.E., Nascimento, L.S., Fernandes, G.M., Santos, M.P., Kim, B.S.M., Carvalho, M.U., Figueira, R.C.L., Cavalcante, R.M., Grassi, M.T., Abessa, D.M.S.
<https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108715>
3. *Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster. **Journal of Hazardous Materials Advances** 9, 100250, 2023.*
Yamamoto, F.Y., Pauly, G.F.E., Nascimento, L.S., Fernandes, G.M., Santos, M.P., Figueira, R.C.L., Cavalcante, R.M., Grassi, M.T., Abessa, D.M.S.
<https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2023.100250>
4. *Earlier biomarkers in fish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce River Basin. **Environmental Pollution**, 329, 121720, 2023.*
Yamamoto, F.Y., Onishi, K., Ralha, T. R., Silva, L.F.O., Deda, B. Pessali, T.Y. C., Souza, C., Oliveira Ribeiro., C.A., Abessa, D.M.S.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121720>
5. *Linking MS1 and MS2 signals in positive and negative modes of LC-HRMS in untargeted metabolomics using the ROIMCR approach. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, 415(25):6213-6225, 2023.*
Flávia Yoshie Yamamoto, Carlos Pérez-López, Ana López Antia, Silvia Lacorte, Denis Moledo de Souza Abessa, Romà Tauler
<https://doi.org/10.1007/s00216-023-04893-3>

Trabalhos em fase de preparação resultantes do auxílio da FAPESP

6. *Endocrine disruption and histopathology in fish from Doce River as relevant endpoints of ecological disturbance*

Revista a ser submetida: Chemosphere

Co-Authors: Yamamoto, F.Y., Ajala, L.B., Ortolani Machado, C.F.; Oliveira Ribeiro., C.A.^b, Favaro, L.F.; Abessa, D. M. S.

Artigos em fase final de elaboração resultantes do auxílio da FAPESP (primeira autoria, BEPE)⁴:

7. *Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental complex mixtures from Doce River in brazilian fish embryos (first draft written, incomplete version missing conclusion of discussion) – to be submitted in Environmental Science and Technology Journal*

Flávia Yoshie Yamamoto^{ab}, Larissa Ajala Batista^c, Mayara Padovan Santos^d, Carmen Bedia Gírbés^a, Silvia Lacorte Bruguera^a, Marcos Tadeu Grassi^d, Denis Moledo de Souza Abessa^b, Romà Tauler^a

Fase inicial de elaboração:

8. *Simultaneous detection and identification of multiple metabolites standards as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics (data analysis complete, draft not written)*

Flávia Yoshie Yamamoto^{ab} & Ana Lópes Antia^a, Bernat Oró-Nolla^a, Silvia Lacorte^a, Denis Moledo de Souza Abessa^b, Romà Tauler^a

- Co-autoria

Artigos publicados (resultantes do auxílio da FAPESP):

1. *Spatial-temporal variations of inorganic contaminants in the sediments from doce river and their bioaccumulation in Corbicula fluminea*

Revista: Integrated Environmental Assessment

Authors: Pauly, Guacira; Cruz, Ana; Trevizani, Tailisi; Kim, Bianca Sung Mi; Perina, Fernando; Yamamoto, Flavia; Figueira, Rubens; Abessa, Denis Moledo de Souza

Artigos publicados (não resultantes do auxílio da FAPESP, mas com reconhecimento da bolsa):

1. *Ecotoxicity of losartan potassium in aquatic organisms of different trophic levels.*

Reque, R., Carneiro, R. D., Yamamoto, F. Y., Ramsdorf, W. A., Martins, L. R., Guiloski, I. C., & de Freitas, A. M. (2021). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87, 103727. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103727>

2. *Levels, source appointment, and ecological risk of petroleum hydrocarbons in tropical coastal ecosystems (northeast Brazil): Baseline for future monitoring programmes of an oil spill area.*

Fernandes, G. M., Martins, D. A., dos Santos, R. P., de Santiago, I. S., Nascimento, L. S., Oliveira, A. H. B., Yamamoto, F. Y., & Cavalcante, R. M. (2022).

⁴ Trabalhos preparados como primeira autora no ANEXO V

Environmental Pollution, 296(July 2021).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118709>

3. *Acute toxicity characterization of organic UV-filters and chronic exposure revealing multigenerational effects in DAPHNIA MAGNA. Ecotoxicology*, 31(9), 1413–1425.
<https://doi.org/10.1007/S10646-022-02598-4/FIGURES/1>
de Paula, V. de C. S., Gomes, M. F., Martins, L. R. R., Yamamoto, F. Y., & de Freitas, A. M. (2022).
4. *Sublethal effects of the herbicides atrazine and glyphosate at environmentally relevant concentrations on South American catfish (Rhamdia quelen) embryos. Environmental Toxicology and Pharmacology*, 98, 104057.
Bordin, E. R., Yamamoto, F. Y., Mannes, Y., Munhoz, R. C., Muelbert, J. R. E., de Freitas, A. M., Cestari, M. M., & Ramsdorf, W. A. (2023).
<https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2022.104057>
5. *Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (Rhamdia quelen) embryos. Chemosphere*, 263, 127985.
Gomes, M. F., de Carvalho Soares de Paula, V., Rocha Martins, L. R., Esquivel Garcia, J. R., Yamamoto, F. Y., & Martins de Freitas, A. (2021).
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127985>

Sem o reconhecimento da bolsa FAPESP

1. *Science Policy Report: A new vision of sustainable management in mining and post-mining landscapes*, 2019. ISBN: 978-3-8047-4026-6

Trabalhos como co-autora, em fase de preparação resultantes do auxílio da FAPESP⁵

Alunas de doutorado sob co-orientação:

- Ana Marta Schafaschek

1. *Impacts from multiple sources of pollution on Chironomids exposed to sediments of the Doce river basin*
2. *Changes in biochemical and molecular endpoints in Chironomus sancticarli exposed to sediments of the Doce river basin*

- Larissa Ajala Batista

3. *A pretty kettle of fish: bioaccumulation of metallic and organic contaminants in fishes from the Doce River Basin following the worst technological disaster of the world's mining industry*

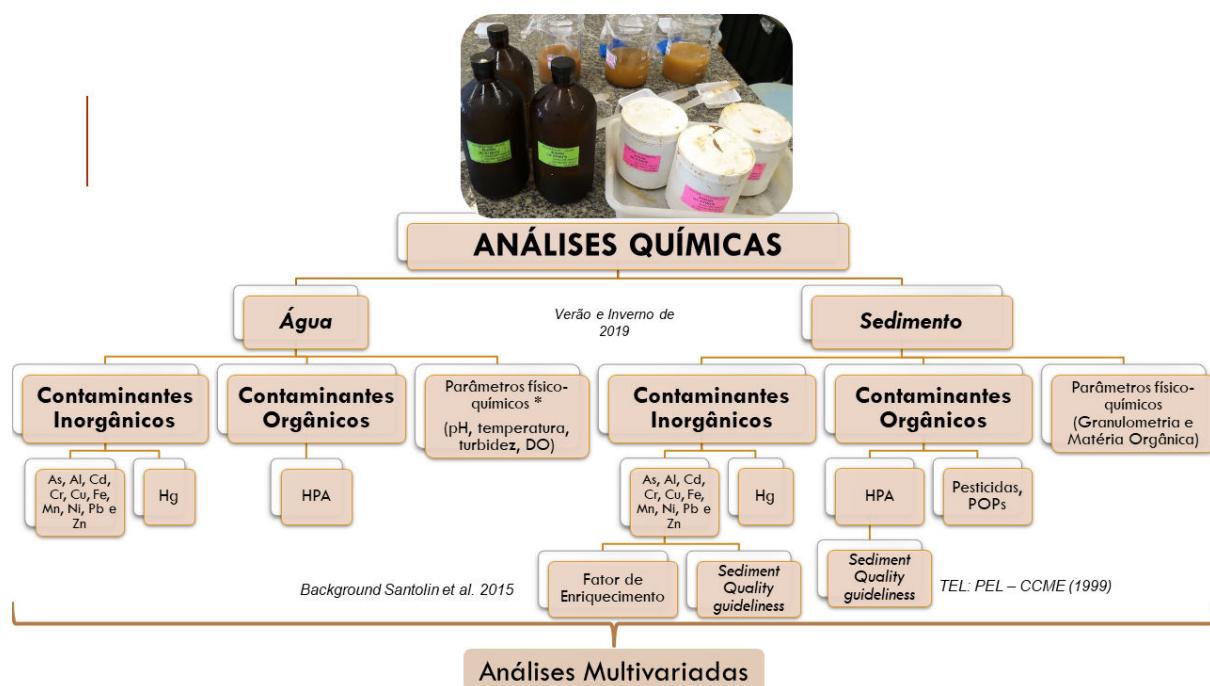
⁵ Resumo dos resultados obtidos pelos alunos sob co-orientação apresentados no ANEXO VI

Esquemas representativos de todas as análises realizadas durante o pós-doutorado:

Artigo 1 - *Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster.*

Artigo 2 - *Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster*

Figura 1. Esquema representativo das análises realizadas para o primeiro e segundo artigos.



Conforme o esquema acima apresentado, este trabalho publicado descreve sobre as análises dos contaminantes inorgânicos e orgânicos detectados na água e sedimentos da Bacia do Rio Doce. Toda a organização das coletas (quatro campanhas em 2019; preparo do material e organização da logística), bem como parte dos procedimentos de extração das amostras (orgânicos/água, inorgânicos/sedimento) foram realizados na Instituição Sede (UNESP-CLP). Os resultados foram obtidos através de parcerias com os grupos de pesquisa coordenados pelos: Prof. Rubens Cesar Lopes Figueira – USP (Instituto Oceanográfico), Prof. Marco Tadeu Grassi - UFPR (Grupo de Química Ambiental) e Prof. Rivelino Martins Cavalcante – UFC (Instituto de Ciências do Mar).

Artigo 3 - *From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River*

Figura 2. Esquema representativo das análises realizadas para o terceiro artigo.



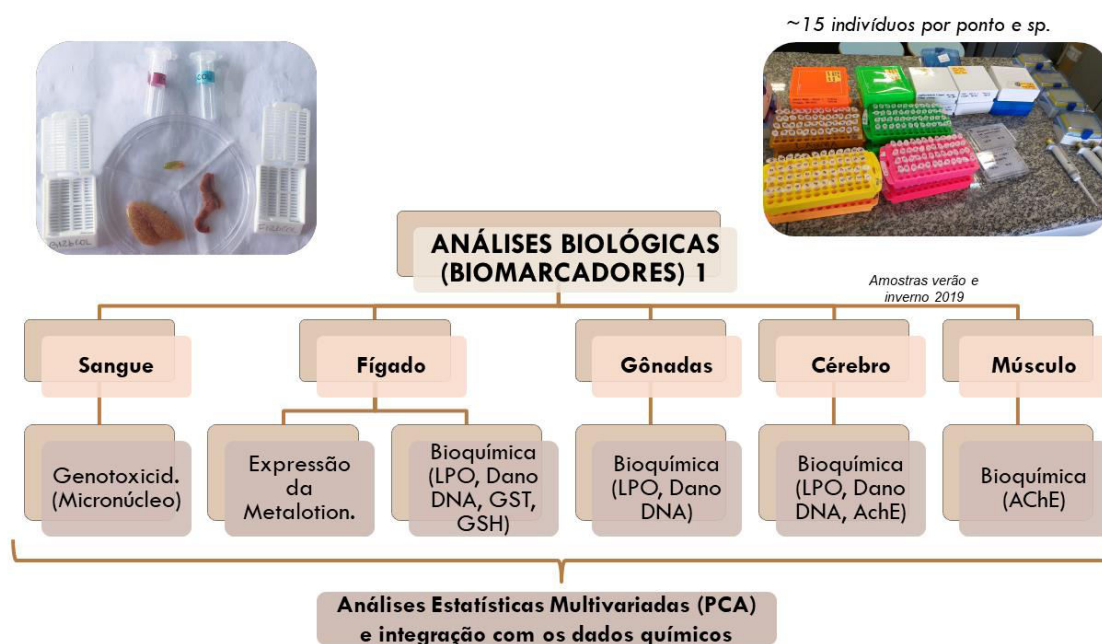
Este artigo referente ao teste de toxicidade com embriões de peixes nativos expostos aos elutriatos do Rio Doce foi publicado na Revista Science of the Total Environment após convite para submissão com a apresentação dos resultados no Congresso Internacional 9th Ibero-American Congress on Contamination and Environmental Toxicology.

Uma vez que os embriões de jundiás foram obtidos na Piscicultura Panamá⁶ (Paulo Lopes, SC, parceria com o professor Juan R.E. Garcia – Unisul), o experimento foi realizado na UTFPR (duração de 1 semana), para evitar um maior tempo de deslocamento, e as amostras obtidas foram transportadas congeladas e analisadas na Instituição sede (UNESP-CLP). O desenvolvimento do modelo matemático foi realizado em parceria com a aluna Msc. Angie Thaisa Costa Souza (UFPR) (Modelagem Matemática) e as análises multivariadas através da colaboração do Prof. André A. Padial (UFPR).

⁶ Foram realizadas buscas de outras pisciculturas no Estado de São Paulo que pudessem fornecer os embriões de jundiás, porém não houve sucesso na pesquisa.

Artigo 4 - *Earlier biomarkers in fish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce River Basin*

Figura 3. Esquema representativo das análises realizadas para o quarto artigo.

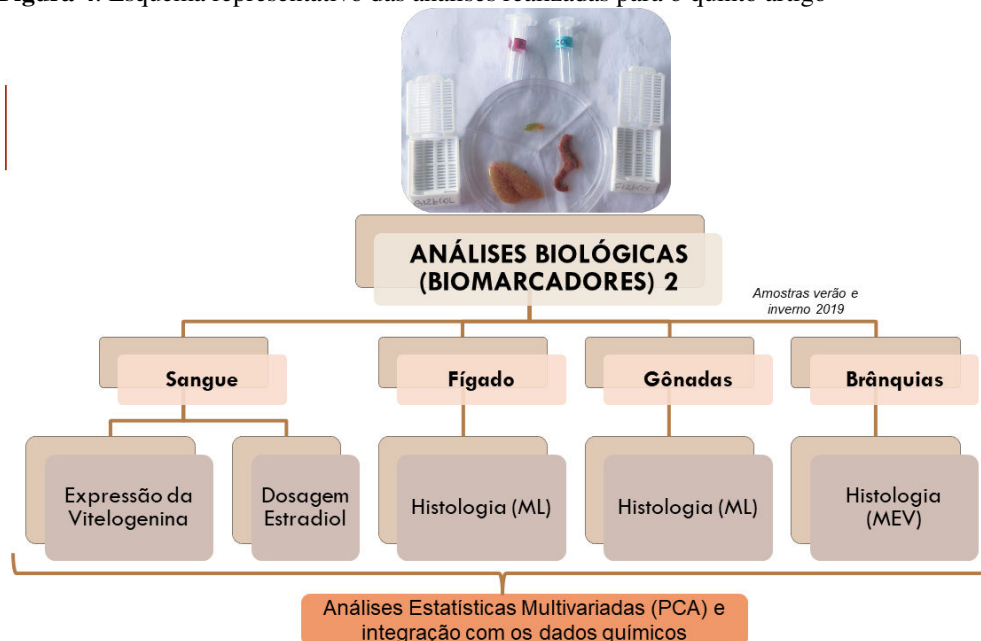


Em azul estão indicadas as análises concluídas e em laranja as análises que não puderam ser finalizadas.

Para este artigo foram realizadas análises de biomarcadores bioquímicos em diferentes órgãos dos peixes coletados no Rio Doce, correlacionados com a presença dos poluentes detectados na água e sedimentos do rio. Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Instituição sede com o auxílio de três alunas de Iniciação científica (Kaori Onishi, Isabella Beverari e Thaisa R. Rodrigues) do curso de Ciências Biológicas da UNESP-CLP. A análise da expressão da metalotioneína foi realizada na UFPR com o auxílio do Dr. Claudemir Souza e colaboração com o Prof. Ciro A.O. Ribeiro. Por fim as análises de genotoxicidade foram conduzidas pela Dra. Laís Oya da UFPR.

Artigo 5 - *Endocrine disruption and histopathology in fish from Doce River as endpoints of greater ecological relevance*

Figura 4. Esquema representativo das análises realizadas para o quinto artigo



Para este artigo objetivou-se descrever os efeitos nos peixes, dos poluentes presentes no Rio Doce, através de biomarcadores de maiores níveis de organização biológica (maior relevância ambiental) do que os apresentados no artigo 4. Análises multivariadas foram utilizadas para integrar os dados dos biomarcadores deste estudo (desregulação endócrina e a histologia) com os dados químicos reportados nos artigos 1 e 2, e provavelmente serão realizados também com os dados de bioacumulação (doutorado da aluna Larissa Batista).

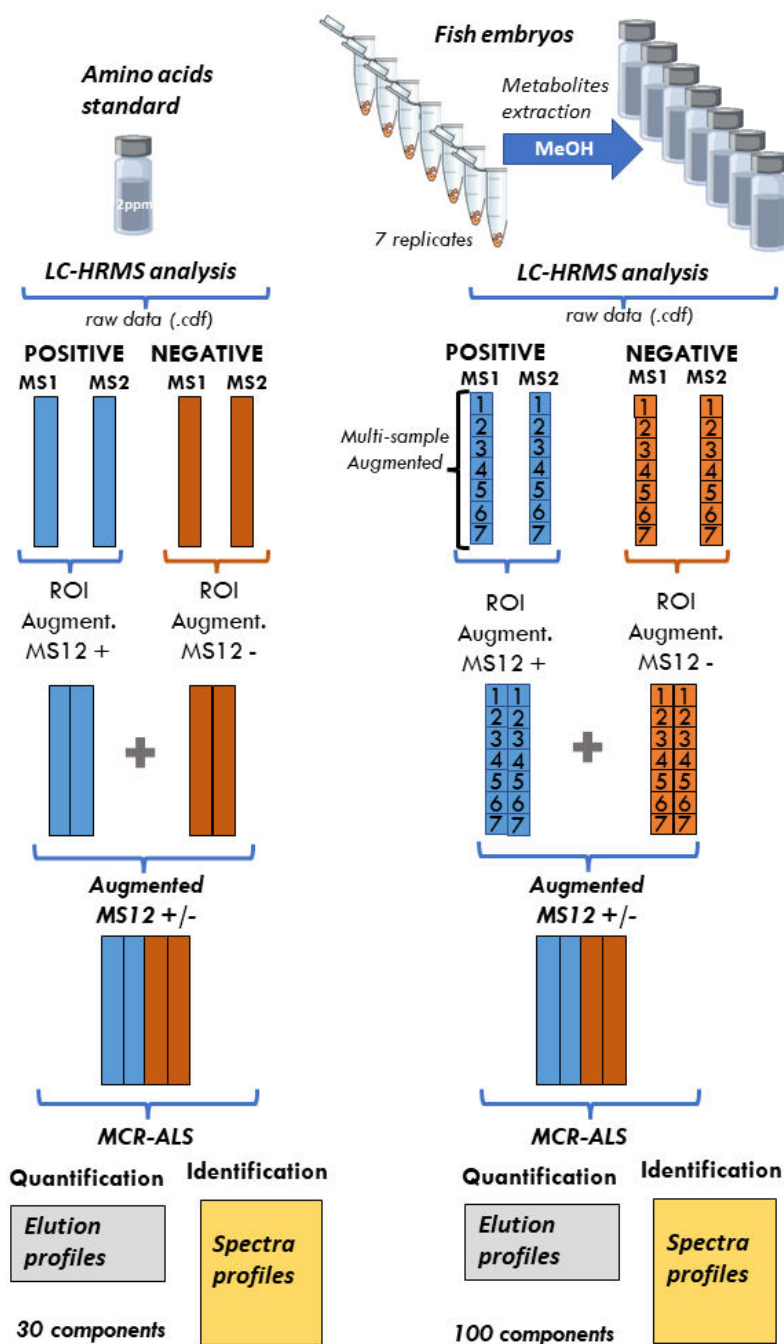
Parte das análises histológicas do fígado foram realizadas pela aluna de IC Kaori Onishi (bolsista Fapesp) e outra parte em parceria com Msc. Cláudia Neves Correa e Gabriela Pustiglione Marinsek, realizadas na Instituição Sede (UNESP-CLP). A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR através de uma parceria com a Prof. Cláudia Feijó Ortolani-Machado. Por fim, a análise da histologia das gônadas foi conduzida pela aluna Msc. Larissa Ajala Batista sob supervisão do Prof. Dr. Luís F. Fávaro – UFPR (Laboratório de Reprodução e Comunidade de Peixes).

Referente a outras colaborações e co-orientações com auxílio da Fapesp, serão publicados artigos: com os dados de bioacumulação dos peixes coletados, pela aluna Larissa Batista (UFPR); com dados de biomarcadores de *Chironomidae* expostos ao sedimento do Rio Doce pela aluna Ana Schafaschek (UFPR); com os dados dos testes de toxicidade com sedimento e águas do Rio Doce pela aluna Guacira Pauly.

Trabalhos resultantes do estágio desenvolvido no exterior (BEPE)

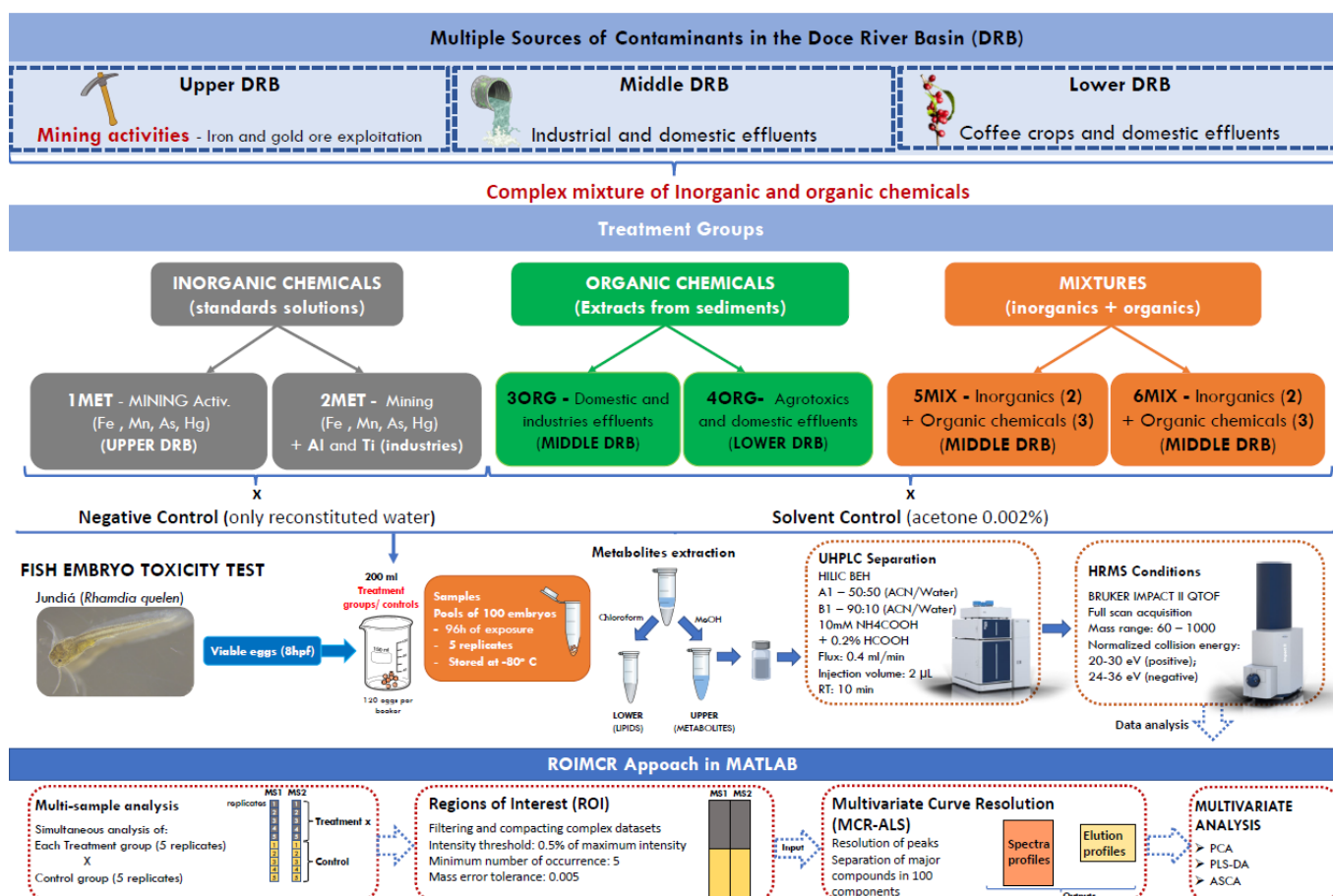
Artigo 6. *Linking MS1 and MS2 signals in positive and negative modes of LC-HRMS in untargeted metabolomics using the ROIMCR approach*

Figura 5. Fluxo de trabalho da análise ROIMCR para a identificação de aminoácidos em solução padrão ou amostras de embriões de peixe, através de conjuntos de dados arranjados de modos de ionização positivos e negativos. Para cada modo de aquisição, os conjuntos de dados MS1 e MS2 também são combinados para facilitar a identificação dos recursos.



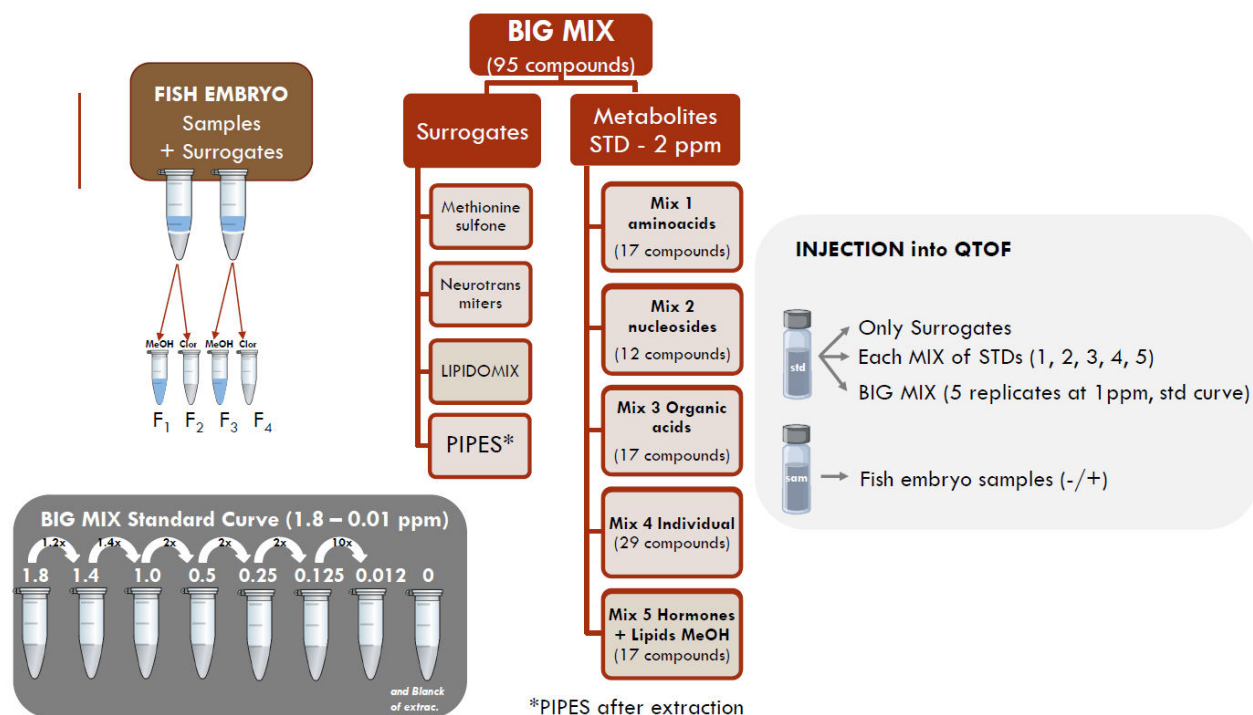
Artigo 7. Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental complex mixtures from Doce River in brazilian fish embryos

Figura 6. Fluxo de trabalho da abordagem metabolômica baseada em LC-HRMS combinada com ROIMCR para a análise de dados na identificação dos principais metabólitos alterados em amostras de embriões de peixes após exposição a diferentes misturas de contaminantes inorgânicos e orgânicos (isolados e combinados) presentes no Rio Doce. As misturas de contaminantes nos grupos de tratamento foram selecionadas de acordo com as fontes de poluição presentes ao longo do rio Doce e considerando as concentrações ambientais relevantes desses produtos químicos. Além do método de Resolução de Curva Multivariada, outras análises multivariadas foram aplicadas para observar as diferenças nos padrões de regulação dos metabólitos sob distintas condições de exposição química.



Artigo 8. *Simultaneous detection and identification of multiple metabolites standards as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics*

Figura 7. Diferentes misturas de metabólitos padrões foram selecionadas para serem usadas como poderosos biomarcadores em metabolômica direcionada e não direcionada. Seis misturas diferentes foram preparadas para abordar metabólitos de aminoácidos (1), nucleosídeos (2), ácidos orgânicos (3), outros metabólitos polares (4), hormônios lipídicos e outros metabólitos hidrofóbicos (5) e uma mistura de *surrogates* e padrões internos. Adicionalmente, foi realizada uma mistura *big mix* contendo um total de 95 compostos com a combinação de todas as 6 misturas, diluídas em diferentes concentrações para obtenção de uma curva padrão para sua quantificação na abordagem alvo.



Conclusão das atividades realizadas durante todo o pós-doutorado

De forma geral, é possível observar que os objetivos propostos inicialmente no Projeto foram alcançados com sucesso: i) Realização de análises químicas de contaminantes inorgânicos e orgânicos presentes na água, sedimentos e tecidos dos peixes; ii) Avaliação da saúde geral de diferentes espécies de peixes adultos coletados no Rio Doce, através do uso de múltiplos biomarcadores de diferentes níveis de organização biológica; iii) Avaliação dos efeitos tóxicos dos poluentes do Rio Doce nos estágios iniciais do desenvolvimento em embriões de jundiás e a aplicação do modelo matemático para simulação dos efeitos a longo prazo. Além disso, foram incluídos os experimentos para a abordagem metabolômica e análises quimiométricas da mistura de padrões de metabólitos para aplicações na metabolômica não-alvo.

Com relação aos resultados inicialmente esperados, também é possível verificar uma correspondência com os alcançados, principalmente referentes: i) ao desenvolvimento de uma ferramenta integrada para avaliar os impactos, baseada em múltiplas linhas de evidência; ii) Geração de informações sobre os processos de recuperação na fase pós-desastre; iii) Geração de dados que auxiliem na tomada de decisões por parte das autoridades públicas e sensibilização e conscientização das agências governamentais/ Institutos ambientais sobre a importância das avaliações de risco que incluam análises ecotoxicológicas nos organismos diretamente expostos no ambiente; iv) Treinamento e capacitação de alunos de iniciação científica, de mestrado e doutorado para realização de diferentes análises (bioquímicas, morfológicas), assim como auxiliar na interpretação dos dados obtidos.

Por fim, é importante mencionar que para alcançar tais resultados, diversos desafios científicos e metodológicos foram superados com êxito, dentre eles: i) a coleta amostral suficiente de peixes adultos na Bacia do Rio Doce; ii) a realização de múltiplas análises e amostras através do estabelecimento de diversas parcerias com grupos de pesquisas nacionais (UNESP-CLP, IO-USP, UFPR, UFC, UTFPR) e internacionais (IDAEA-CSIC); iii) análises de embriotoxicidade com o uso de uma espécie nativa e a modelagem matemática; iv) aprendizado de novas técnicas e abordagens nas análises multivariadas, metabolômicas e quimiométricas; v) atraso de diversas análises devido ao período da pandemia do COVID-19.

Atividades concluídas desde o último período⁷

1. Conclusão das análises químicas – i) Releitura de amostras que excederam a curva padrão (inorgânicos); ii) agrotóxicos na água e no sedimento; POPs no sedimento
2. Conclusão das análises histopatológicas no fígado e gônadas
3. Análises multivariadas dos dados químicos, e publicação dos Artigos 1 e 2
4. Análises multivariadas do experimento com os embriões de jundiá, e publicação do artigo 3
5. Análises multivariadas das respostas dos biomarcadores, e submissão do artigo 4
6. Análises multivariadas histologia e desregulação endócrina, e redação do artigo 5 em andamento (Auxílio da aluna sob co-orientação Larissa Batista)
7. Análise Bioacumulação e redação do artigo em andamento (Co-orientação aluna Larissa Batista)
8. Análise Metabolômica dos embriões de jundiás pela proposta BEPE e redação do artigo em fases finais de elaboração
9. Análises quimiométricas pelo método ROIMCR de padrões de metabólitos para sua aplicação na Metabolômica não-alvo (referentes ao BEPE) e redação dos artigos em fases finais e iniciais de elaboração

	09/21	10/21	11/21	12/21	01/22	02/22	03-09/22	09-12/22	01-03/2023
1	X	X			X	X			X
2		X	X	X			X	X	
3		X	X	X			X	X	
4			X			X	X		
5		X	X					X	X
6			X	X	X			X	X
7			X	X	X			X	X
8*				X	X	X	X	X	X
9						X	X	X	X

⁷ Descrição detalhada dos resultados obtidos no último período, não apresentados nas publicações, no ANEXO VI.

ANEXO I – Informações detalhadas referentes aos RELATÓRIOS PARCIAIS I e II

Atividades apresentadas para o Relatório I (01/09/2018 a 31/05/2020):

RESUMO (RESULTADOS PARCIAIS)

Vários estudos têm mostrado os impactos ambientais da mineração e do rompimento da barragem do Fundão, no Rio Doce. Análises químicas na água detectaram ao longo do percurso do rio, elevadas concentrações de elementos como Fe, Al, Mn, e os de maior potencial tóxico como As, Cd e Pb após o acidente. Apesar dos seus efeitos na biota parecerem evidentes, poucos estudos investigaram as respostas desencadeadas nos peixes considerando toda a extensão do rio, bem como a maioria têm negligenciado a ocorrência de contaminantes orgânicos e suas misturas complexas com os metais. Desta forma, o presente projeto tem como objetivo avaliar a qualidade ambiental após o acidente, através de diversas abordagens que integrem tanto os aspectos abióticos como os bióticos deste ecossistema. Para este estudo foram coletadas amostras de água e sedimento em 8 locais da bacia do Rio Doce para a detecção e quantificação dos poluentes (metais e compostos orgânicos), assim como a captura de 474 peixes adultos (lambaris, jundiás e mandis), em duas estações do ano de 2019, para a avaliação dos parâmetros biológicos: bioacumulação, biomarcadores bioquímicos, moleculares, histopatológicos. Adicionalmente foi realizado um teste de toxicidade com embriões de jundiá expostos ao elutriado do Rio Doce durante 96hpf para verificar as respostas desencadeadas nas fases iniciais do desenvolvimento. Os resultados preliminares mostraram que os peixes coletados no Alto Rio Doce (local mais próximo do rompimento da barragem) apresentaram mais respostas de toxicidade: como elevados níveis de peroxidação lipídica, menores níveis de antioxidantes, alterações morfológicas nucleares nos eritrócitos e nas brânquias, assim como maiores taxas de deformidades nos embriões, sendo provável que estas respostas estejam associadas aos elevados níveis de metais presente neste ambiente. Já no médio Rio Doce os peixes apresentaram danos no DNA, assim como a expressão da vitelogenina em peixes machos, e deformidades nos embriões o que sugere que outras fontes de poluição locais possam estar causando estes efeitos. Enquanto no baixo Rio Doce, a maior atividade da AChE nos peixes do baixo Rio Doce, pode representar uma resposta de exposição à outros contaminantes na região, como os pesticidas. Portanto, os resultados sugerem que diferentes fontes de poluição, pontuais e difusas, desencadeiam

distintas respostas nos peixes, não havendo um gradiente de contaminação contínuo ao longo do Rio Doce. Com a conclusão das análises e a integração de todos os dados deste estudo, através da estatística multivariada, será possível fornecer um diagnóstico mais completo da qualidade ambiental da Bacia do Rio Doce, servindo de suporte para tomadas de decisões por parte das autoridades públicas.

ENUNCIADO DO PROBLEMA

As atividades de mineração e a agricultura representam setores básicos da economia mundial que são responsáveis por causar consideráveis impactos ambientais. Normalmente, a extração de minérios implica em uma alteração no meio ambiente significativa, devido à supressão da vegetação e aos processos de contaminação da água e do solo decorrentes da geração de resíduos tóxicos sem os devidos controles apropriados (Mechi & Sanches, 2010).

Entre as principais regiões de mineração no Brasil, pode-se citar o Quadrilátero Ferrífero (QF), localizado no centro-sudeste do estado de Minas Gerais, onde ocorre intensa extração do minério de ferro, além da exploração de manganês e ouro, em menor escala (Roeser & Roeser, 2010). A ampla atividade garimpeira realizada por mais de 300 anos no QF, teve como uma de suas piores consequências a liberação do mercúrio no ambiente devido ao seu uso para a amalgamação do ouro (Varejão, Bellato, & Fontes, 2009). Outro elemento mobilizado no ambiente como subproduto do ouro é o Arsênio, o qual se encontra na primeira posição da lista de prioridade das substâncias perigosas da Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2014). Estima-se que somente na região do QF em torno de 390.000 toneladas de As tenham sido introduzidas no ambiente (Borba, Figueiredo, & Matschullat, 2003). Já o ferro, mesmo sendo um metal essencial com exploração relativamente mais recente no QF, também contribui significativamente com o quadro de contaminação crônica de metais existente no local (Rodrigues et al., 2014).

Este cenário é evidenciado pelas altas concentrações de metais, como Fe, Hg, e do metaloide As detectados no trecho próximo à nascente da Bacia do Rio Doce (Alto Rio Doce), no município de Mariana, onde se encontram três grandes reservatórios de rejeitos de ferro da empresa Samarco (Rhodes, 2010). Além do impacto da mineração do QF, a Bacia do Rio Doce está sujeita a outras atividades humanas como a agricultura, bovinocultura e indústrias, as quais predominam nos trechos do médio e baixo Rio Doce.

Nas regiões urbanas, com destaque para a cidade de Governador Valadares, ocorre também intensa descarga de efluentes domésticos e industriais sem haver um tratamento adequado (Veado, Menezes, Queiroz, Costa, & Oliveira, 2009). A atividade siderúrgica na região do Vale do aço está diretamente relacionada aos altos níveis de As e alguns metais como Al, Cr e Fe, detectados em concentrações acima dos valores máximos permitidos na água (Vasconcelos et al., 2011). Ao longo do percurso do Rio Doce, outros metais como Cr, Cu, Zn, Hg e Pb analisados no sedimento, também já foram detectados em níveis acima do recomendado pela legislação (Santolin, Ciminelli, Nascentes, & Windmüller, 2015).

Tanto os metais essenciais como os não-essenciais, os quais apresentam maior potencial tóxico, quando acumulados em maiores níveis no ambiente podem causar efeitos adversos sobre a biota e provocar risco de exposição à população humana (Monroy, Maceda-Veiga, & de Sostoa, 2014; Yi, Yang, & Zhang, 2011). Apesar de a literatura descrever concentrações ambientais moderadas a altas de metais na Bacia do Rio Doce, tanto na água como no sedimento, pouco se encontra a respeito dos níveis de metais acumulados na biota, os efeitos nos organismos diretamente expostos, e os impactos crônicos de longo prazo (Almeida, 2007; Veado et al., 2009).

Para agravar as condições de contaminação crônica existente na Bacia do Rio Doce, no dia 05 de novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de rejeitos do Fundão, na região de Mariana, causando a desestruturação dos ecossistemas associados. Neste evento catastrófico, considerado como o pior desastre ambiental da história do Brasil, aproximadamente 50 milhões de m³ de rejeitos de minério de ferro foram introduzidos nos corpos hídricos (Rio Gualaxo do Norte, Rio do Carmo e Rio Doce), afetando Áreas de Preservação Permanente e percorrendo mais de 600 km até alcançar o Oceano Atlântico. Além do grande prejuízo socioeconômico causado, entre eles a perda de vidas humanas, o desalojamento de populações, a interrupção do abastecimento de água e da pesca, houve também uma mortandade massiva da biodiversidade aquática, assim como da fauna e flora terrestre (IBAMA, 2015).

A recuperação dos danos e o desenvolvimento de espécies na região deverão ocorrer apenas em médio e longo prazo, já que houve o comprometimento da capacidade de resiliência e processos de sucessão dos trechos atingidos. Para alguns autores, possivelmente o impacto causado será considerado como irreversível, com a extinção de espécies endêmicas ameaçadas (Miranda & Marques, 2016) e o estabelecimento de um ecossistema distinto do original. Neste caso, a dizimação da ictiofauna dos Rios Gualaxo

do Norte, Carmo e Doce, em período reprodutivo, assim como a desestruturação da cadeia trófica e a alteração na qualidade da água, dificultarão a restauração de novas populações de peixes (IBAMA, 2015).

Desta forma, maior atenção das autoridades públicas ainda se faz necessária para que sejam avaliados os reais danos causados neste ecossistema, assim como os potenciais riscos futuros decorrentes da (re)distribuição dos rejeitos de minérios ao longo do Rio Doce. Parte dos metais depositados nos sedimentos, após o acidente, foi mobilizada e se tornou biodisponível para os organismos. Os resultados prévios das análises químicas divulgados pelo GIAIA (2016) e pelo IBAMA (2015) confirmaram a presença de As, Cd, Pb, Cr, Mn, Ni e Se total, e Cianeto livre na água em níveis acima do permitido, de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 para corpos d'água de Classe II, em diversos pontos ao longo da bacia do Rio Doce. Elementos como o Mn e Se foram detectados em concentrações até 22 e 53 vezes acima das permitidas, respectivamente. As concentrações de Fe e Al dissolvidos na água estavam acima do valor permitido em alguns pontos, enquanto as concentrações de Fe e Al totais na água, mesmo não havendo padrão de legislação comparativa, estavam extremamente altas em todos os pontos de coleta afetados pela lama de rejeito. Após dois e quatro meses destas primeiras análises realizadas em Dezembro de 2015 pelo IBAMA (2015) e GIAIA (2016), respectivamente, observou-se que a maior parte destes metais voltou a estar em conformidade com os limites estabelecidos na Resolução CONAMA 357/2005, com exceção do Manganês que permaneceu acima do limite em alguns locais de coleta.

No compartimento sedimento, analisado somente nos pontos do Estado do Espírito Santo, não houve um padrão definido na análise dos metais e outros parâmetros tanto para as diferentes coletas, como para os locais amostrados (IBAMA, 2015). As concentrações de Pb, Cr, Ni, Zi, Cu e Hg apresentaram alguns valores acima dos limites estabelecidos pelo CONAMA 454/2012^{*1}, principalmente nas regiões mais próximas a montante, enquanto o As apresentou concentrações acima dos limites preconizados nos pontos mais próximos à foz do Rio Doce. Portanto, ainda são necessárias análises que investiguem melhor a distribuição dos metais e outros compostos nos diferentes

¹ * CONAMA 454/2012 – Não há legislação específica para a avaliação da qualidade de sedimentos, sendo necessária uma comparação dos dados através da legislação vigente para Gestão de resíduos e produtos perigosos para material dragado, a qual pode levar à uma interpretação inapropriada dos resultados.

compartimentos abióticos e bióticos, ao longo do percurso do Rio Doce, para uma avaliação mais adequada da contaminação ambiental.

Com relação aos parâmetros físico-químicos analisados, observou-se um aumento brusco na turbidez da água no período do acidente, com posterior diminuição, ficando mais próximo ao limite legal (GIAIA, 2016; IBAMA, 2015). De forma semelhante, os níveis de oxigênio dissolvido também se encontraram abaixo do permitido, retornando aos níveis normais nas mesmas épocas de coleta. Apesar da importância dos parâmetros físico-químicos e das análises químicas na avaliação da qualidade da água, estas análises apresentam limitações por não informarem a biodisponibilidade e toxicidade dos compostos químicos nos organismos. As análises químicas por si só também são insuficientes para prever os reais riscos de exposição e seus potenciais efeitos na biota. Desta forma, um diagnóstico subestimando ou superestimando a qualidade da água pode ser fornecido se apenas estas análises forem consideradas, como já demonstrado em outros estudos de biomonitoramento (Santos et al., 2016; Yamamoto et al., 2016). Assim, uma avaliação de risco ideal requer a integração de dados obtidos por meio da detecção de diversos poluentes no ambiente (i.e., análises químicas dos meios potencialmente contaminados) e sua consequente bioacumulação nos organismos aquáticos, bem como os efeitos que estes compostos possam estar causando à biota (Van der Oost et al., 2003), nos diferentes níveis de organização biológica.

As avaliações de risco têm como objetivo analisar as probabilidades e magnitudes das consequências e efeitos adversos das atividades humanas ou catástrofes naturais (Browning; Thomas, 2016; Bui et al., 2016; Gunasekera et al., 2015). Este processo consiste em diferentes etapas, incluindo a caracterização dos agentes estressores em potencial, assim como dos riscos de exposição (identificação dos meios contaminados, das formas químicas e do potencial tóxico dos poluentes), a caracterização dos efeitos adversos causados pela exposição aos agentes estressores, classificação e redução dos riscos, e o biomonitoramento (Cachada et al., 2016; Kühnel; Nickel, 2014). Este último pode informar melhor as associações entre os possíveis riscos de exposição e efeitos para um determinado ambiente (Laane et al., 2013), consistindo em uma rotina de avaliação dos parâmetros biológicos ao longo do tempo (SOBUS et al., 2011).

Os peixes são considerados bons modelos animais para estes estudos, pois além de apresentarem características que colaboram com seu uso em diferentes desenhos experimentais, como a fácil adaptabilidade (Kapoor & Khanna, 2004), eles estão em contato direto com o ambiente aquático (Zhu et al., 2015). São organismos indicadores

ambientais de grande relevância ecológica, com ampla biodiversidade e por se enquadrarem em níveis tróficos superiores, podendo responder à presença dos poluentes de forma sensível e específica, permitindo uma avaliação da toxicidade através de uma vasta gama de possibilidades metodológicas (Chovanec, Hofer, & Schiemer, 2003; Naigaga et al., 2011; Plessl, Otachi, Körner, Avenant-Oldewage, & Jirsa, 2017). Em uma mesma situação de exposição, os peixes podem naturalmente apresentar diferentes respostas entre as espécies, assim como estão sujeitos a diferentes processos de bioacumulação e biomagnificação dos poluentes (Gray, 2002; Lewis et al., 2011). Portanto, de forma ideal, estudos de biomonitoramento devem considerar análises em mais de uma espécie de peixe, preferencialmente pertencendo a níveis tróficos distintos.

Várias respostas biológicas podem ser influenciadas pela exposição a substâncias químicas, sendo importante uma avaliação em diferentes subníveis de organização biológica. Uma estratégia adequada e amplamente utilizada é uma abordagem multi-biomarcadores, onde podem ser considerados diferentes órgãos-alvo, assim como várias respostas que apresentam diferentes níveis de sensibilidade aos agentes estressores, como os contaminantes químicos (Brito et al., 2012; Santos et al., 2014; Santos et al., 2016; Osório et al., 2014). Dentro do contexto ecotoxicológico, os biomarcadores representam mudanças nas respostas biológicas a nível sub organismo, desde moleculares, celulares, fisiológicas ou comportamentais, relacionadas à exposição e efeitos tóxicos dos poluentes ambientais (Gupta, 2014). Biomarcadores ideais são indicadores sensíveis e específicos de uma exposição química, refletindo a interação entre uma substância e um sistema biológico (Campion et al., 2013).

Em estudos de biomonitoramento, os efeitos toxicológicos dos metais são amplamente avaliados através dos biomarcadores bioquímicos, já que um dos principais mecanismos desencadeados é o estresse oxidativo com diferentes órgãos-alvo sendo afetados (Carvalho, Bernusso, Araújo, Espíndola, & Fernandes, 2012; Gusso-Choueri et al., 2015). Metais redox-ativos como o Fe, Co, Cu e Cr estão envolvidos com as reações de Fenton, aumentando a produção do radical hidroxila, enquanto metais redox-inativos como o As, Cd e Pb podem diminuir níveis de antioxidantes como GSH (Ercal, Gurer-Orhan, & Aykin-Burns, 2001; Lushchak, 2011). As metalotioneínas, proteínas ricas em cisteínas, também são consideradas bons biomarcadores bioquímicos (Bowen & Depledge, 2006), pois são responsáveis pela detoxificação de metais, podendo proteger as células das espécies reativas de oxigênio devido à afinidade entre seus grupos tióis com os metais, como Cd e Hg (Engel & Brouwer, 1989).

Para a avaliação dos efeitos neurotóxicos causados pelos metais, a Acetilcolinesterase (AChE), tanto no cérebro como no músculo, é um biomarcador muito utilizado, podendo ser verificada tanto uma inibição ou mesmo estimulação para sua atividade (Pundir & Chauhan, 2012; Schlenk, 2005). Outro parâmetro importante e frequentemente avaliado são os efeitos genotóxicos, ou seja, as alterações no material genético que podem ser a nível estrutural do DNA, inicialmente, e causar danos no DNA, resultando em efeitos mutacionais e hereditários a longo prazo (Kirsch-Volders et al., 2009; Schrader, 2016). As análises histopatológicas, as quais representam outro nível de organização biológica, podem apresentar várias vantagens como um biomarcador, pois além de constituírem um método rápido e barato, demonstram de forma objetiva o grau de comprometimento de diferentes tecidos e órgãos alvos. Diversos estudos demonstram que a exposição aos metais é capaz de causar várias alterações em órgãos alvos como o fígado e as brânquias, os quais possuem papéis chave no metabolismo de xenobióticos e processos de osmorregulação, respectivamente (de Oliveira Ribeiro, Belger, Pelletier, & Rouleau, 2002; Mela et al., 2007; Wei & Yang, 2015).

Por outro lado, os efeitos endócrinos dos metais são pouco descritos na literatura, com maiores evidências de que o Cd, Hg, As, Mn e Zn possam atuar também como desreguladores endócrinos (DE) (Iavicoli, Fontana, & Bergamaschi, 2009). Estes são definidos pela Organização Mundial da Saúde (2002) como: *“uma substância exógena ou mistura que altera a função do sistema endócrino e consequentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto, ou sua prole, ou (sub)populações”*. Normalmente os modos de ação dos metais não estão associados à interação direta aos receptores estrogênicos, mas sim a uma alteração nos níveis hormonais (Denier, Hill, Rotchell, & Minier, 2009). Alguns metais possuem prováveis atividades estrogênicas, como o Zn, capaz de induzir a expressão da vitelogenina em sapos machos expostos (Falfushynska, Gnatyshyna, Fedoruk, Sokolova, & Stoliar, 2016).

Particularmente, os desreguladores endócrinos capazes de interferir na ação de hormônios esteroides, os quais controlam processos de reprodução, desenvolvimento e comportamentos sexuais, são amplamente estudados devido aos efeitos deletérios relacionados (Hampl et al., 2014a, 2014b). A exposição durante o desenvolvimento representa uma maior “janela de susceptibilidade”, já que estes organismos apresentam maior sensibilidade a estas substâncias, sendo de grande interesse avaliar os efeitos causados durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Core, 2008; Uzumcu e Zachow, 2007).

Grande parte dos estudos dos efeitos endócrinos estão relacionados à capacidade de interação com receptores hormonais, onde a natureza da resposta pode depender da afinidade da ligação. No cenário reprodutivo dos peixes, um dos processos mais bem caracterizado e estabelecido é a expressão da vitelogenina (Marin; Matozzo, 2004; Matozzo et al., 2008; Sumpter; Jobling, 1995). Este biomarcador molecular é amplamente utilizado no diagnóstico de ambientes aquáticos impactados pela atividade humana, devido à sensibilidade e especificidade na detecção de compostos que apresentam atividade endócrina, particularmente estrogênica, ou seja, feminizante (Carballo et al., 2005; Desforges et al., 2010; Santos et al., 2016; Gilannejad et al., 2016; Reinen et al., 2010). Considerando os distintos modos de ação desencadeados pelos DE, afetando o sistema endócrino tanto em humanos como em animais, é importante avaliar diferentes processos alvos no aspecto reprodutivo, desde uma alteração nos processos de síntese dos hormônios esteroides aos efeitos adversos causados no desenvolvimento gonadal.

Apesar de serem considerados vários níveis de organização biológica, o maior foco dos estudos ecotoxicológicos é ainda direcionado aos efeitos no nível de organismos (Jorgensen, 2010). Enquanto isso várias questões relacionadas aos efeitos dos contaminantes em larga escala, ainda permanecem sem respostas (Beketov; Liess, 2012). Desta forma os modelos matemáticos vem sendo cada vez mais utilizados recentemente pois podem auxiliar a compreender como os efeitos dos poluentes a níveis individuais podem se propagar a níveis populacionais ou até de ecossistemas a longo prazo (Barrera, 2013; Brito, 2015)

A modelagem pode ser definida como o processo da utilização de representações matemáticas abstratas de um sistema para analisar ou estudar as relações entre os componentes de um sistema, com o propósito de simular o comportamento de um sistema real (Dixon, 2012). O modelo “*individual-based*”, ou “*agent-based*” permite simular sistemas de populações a partir de organismos individuais discretos, sendo capaz de verificar parâmetros detalhados com alto nível de complexidade e as interações entre os indivíduos e o seu ambiente. Para cada indivíduo podem ser consideradas diversas variáveis de estado (localização espacial, característica fisiológica), atributos e os comportamentos (crescimento, reprodução, seleção do habitat) (DeAngelis & Grimm, 2014). Por estas razões, este tipo de modelo representa uma importante ferramenta, não somente para a ecotoxicologia, mas também para outras disciplinas (Gledhill & Van Kirk, 2011; Grimm et al., 2006)

OBJETIVOS PROPOSTOS INICIALMENTE

Avaliar a toxicidade dos poluentes presentes no Rio Doce em embriões de peixes e indivíduos adultos, com o desenvolvimento de um modelo matemático que demonstre prováveis efeitos toxicológicos à curto, médio e longo prazo.

Objetivos específicos

I – Detectar, por meio de análises químicas, os metais e os contaminantes orgânicos presentes na água e sedimento do Rio Doce e bioacumulados nos tecidos dos peixes (músculo, brânquias e fígado);

II – Avaliar a saúde geral dos peixes adultos (*Geophagus brasiliensis*, *Astyanax bimaculatus*, *Rhamdia quelen*) coletados em diferentes pontos ao longo do Rio Doce em duas épocas distintas (verão e inverno) através das análises histopatológicas no fígado e brânquias, de genotoxicidade (ensaio cometa e micronúcleo das células sanguíneas) e atividade da Acetilcolinesterase no cérebro e músculo;

III – Avaliar os mecanismos de defesa desencadeados nos peixes adultos após exposição aguda aos contaminantes do Rio Doce através dos biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo no fígado e brânquias, atividade da Metalotioneína, e enzimas de biotransformação CYP1A e GST no fígado;

IV – Avaliar a desregulação endócrina afetando os processos reprodutivos dos peixes adultos coletados através da análise de expressão da vitelogenina e dosagem dos hormônios esteroides (estradiol e testosterona) no sangue, expressão da CYP3A (fígado) e CYP19A (gônadas e cérebro), histologia das gônadas de machos e fêmeas;

V – Avaliar os efeitos tóxicos dos poluentes nos estágios iniciais do desenvolvimento em embriões de *Rhamdia quelen* expostos por 96 horas à água e sedimento do Rio doce, através das taxas de letalidade e biomarcadores bioquímicos (estresse oxidativo e acetilcolinesterase);

VI – Exposição *in vivo* de embriões de *zebrafish* a uma mistura de metais nas mesmas concentrações detectadas nos locais de estudo do Rio Doce para verificar os principais mecanismos de ação desencadeados (experimento a ser realizado no exterior, com bolsa BEPE).

VII - Desenvolver um modelo matemático *agent-based* que simule os riscos de exposição dos poluentes do Rio Doce e os efeitos nos peixes a nível populacional a médio e longo prazo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve a aprovação do comitê de ética no uso de animais – CEUA Instituto de Biociências do Campus Litoral Paulista Protocolo nº 12/2018-CEUA (ANEXO II), assim como a autorização pelo SISBIO para captura, coleta e transporte de espécimes da fauna silvestre in situ, com o protocolo nº 65973-2 (ANEXO III).

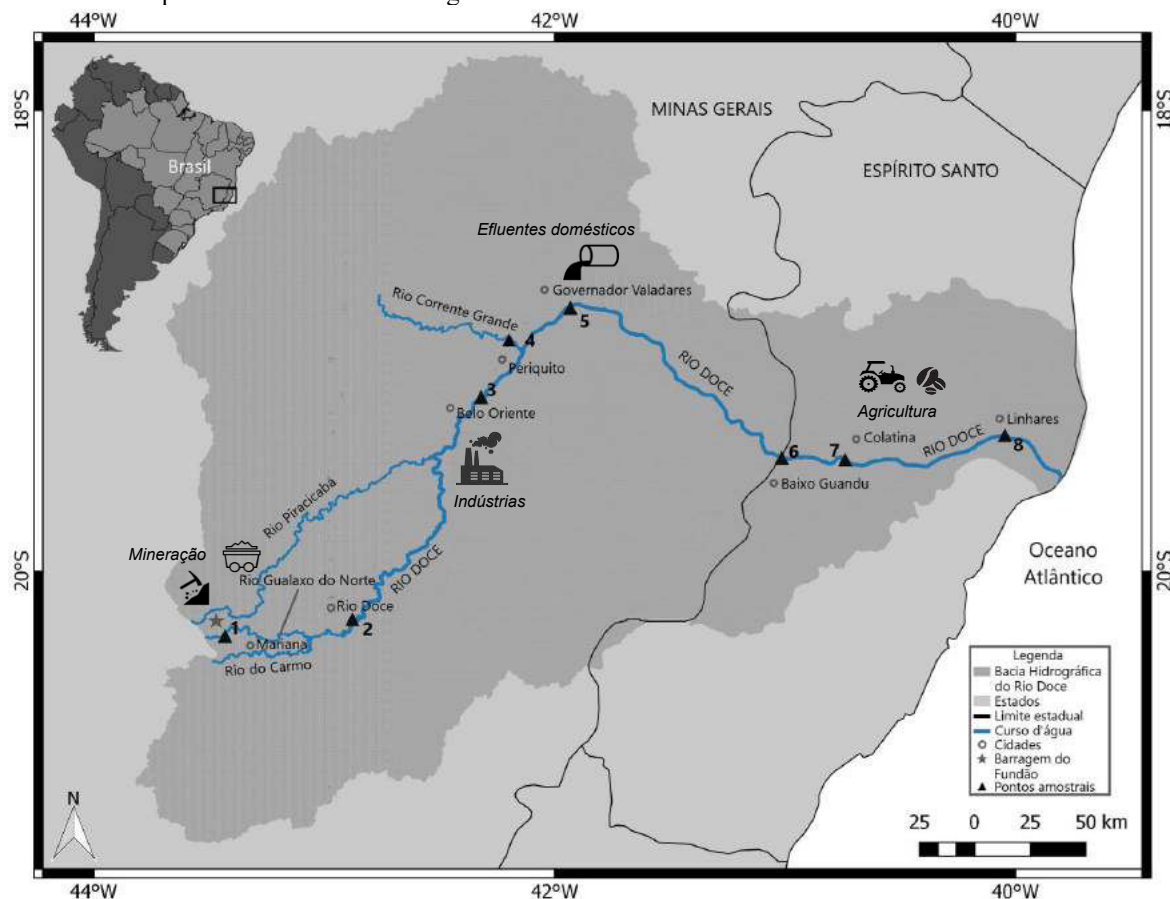
Para a avaliação da influência sazonal-temporal nas análises, foram realizadas duas coletas em 2019, a primeira em Janeiro-Fevereiro de 2019 (verão e época chuvosa) e a segunda em Julho-Agosto de 2019 (inverno e época de seca). Os locais mais apropriados para a coleta foram definidos através de uma visita prévia em campo (11/2018) e com reuniões de especialistas da área e pescadores locais, permitindo a identificação das diferentes fontes de poluição ao longo do Rio, assim como a viabilidade da captura dos peixes e coleta das amostras biológicas. Considerando os diferentes impactos das atividades antrópicas, as distâncias entre os trechos da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (Alto, Médio e Baixo Rio Doce), e os dados já disponíveis na literatura, foram selecionados criteriosamente 8 áreas de amostragem (Tabela 1, Figuras 1 a 4):

TABELA 1. Locais de amostragem da Bacia do Rio Doce em 2019 e as descrições das principais atividades humanas em cada região.

TRECHO	Locais de Coleta	Descrição das atividades humanas (ANA, 2015)
Alto Rio Doce	1 – Rio Gualaxo do Norte (GUA), Município de Mariana, MG	Local mais próximo do rompimento da barragem do Fundão, no município de Mariana MG. Impactado pela atual exploração do minério de Ferro, e do garimpo do ouro durante décadas, o qual ainda ocorre de maneira ilegal.
	2 – Candonga (CAN), Reservatório de Risoleta Neves, Rio Doce, MG	Reservatório da UHE de Risoleta Neves, que conteve aproximadamente 10 milhões de m ³ do rejeito de Fe (1/4) introduzido no Rio Doce.
Médio Rio Doce	3 – Naque, MG (NAQ)	Local à jusante de indústrias siderúrgicas da Cidade de Ipatinga e da Indústria de celulose CENIBRA
	4 – REFERÊNCIA (REF), Rio Corrente, Periquito, MG	Este afluente do Rio Doce foi selecionado como ponto de Referência por estar localizado numa Unidade de Conservação Ambiental (Parque Estadual do Rio Corrente), e não ter sido afetado pela passagem da lama.
	5 – Governador Valadares, MG (GOV)	Cidade mais populosa do Rio Doce (245 mil hab.), com o lançamento do esgoto 100% não tratado no rio
	6 – Aimorés, ES (AIM)	Região onde a atividade agrícola começa a se intensificar

Baixo Rio Doce	7 – Colatina, ES (COL)	Impacto da atividade agrícola (cultivo de café) e urbana
	8 – Linhares, ES (LIN)	Impacto da atividade agrícola (cultivo de café) e urbana

Figura 1. Mapa do Rio Doce com os 8 pontos de amostragem dos peixes, água e sedimento, e as respectivas atividades antrópicas desenvolvidas ao longo da Bacia do Rio Doce



FONTE: Larissa Ajala Batista, 2020.

A Região do Alto Rio Doce (Pontos 1 e 2) sofre maior impacto da atividade de mineração, enquanto o Médio (pontos 3 e 5) e o Baixo Rio Doce (pontos 6, 7 e 8) estão mais sujeitos às atividades industriais e agricultura, respectivamente.

1 – Gualaxo do Norte. 2 – Candonga. 3 – Naque. 4 – Rio Corrente (Referência). 5 – Governador Valadares. 6 – Aimorés. 7 – Colatina. 8 – Linhares.

Apesar da relevância sócio-ambiental, não foi realizada a amostragem na região da foz do Rio Doce, em Regência, devido às condições de salinidade e a ocorrência de diferentes espécies de peixes, as quais não seriam adequadas para comparação com as demais localidades do Rio Doce neste estudo.

Figura 2. Locais de amostragem do Alto Rio Doce: Gualaxo do Norte e Candonga em MG



FONTE: A AUTORA, 2019.

O ponto do Rio Gualaxo do Norte é o mais próximo da barragem do Fundão e do distrito de Bento Rodrigues onde houve o soterramento de casas pelos rejeitos do minério de Ferro, e as obras de reassentamento da Nova Bento Rodrigues pela Fundação Renova. Aproximadamente 100 km distante de Bento Rodrigues e próximo à origem do Rio Doce, encontra-se o reservatório da UHE de Risoleta Neves.

Figura 3. Locais de amostragem do Médio Rio Doce: Naque e Governador Valadares e o Rio Corrente Grande como ponto referência, em MG



FONTE: A AUTORA, 2019.

A cidade de Naque, localizada no médio Rio Doce, fica à jusante de indústrias siderúrgicas e de celulose e representa um dos locais por onde percorre a ferrovia que transporta os minérios de ferro extraídos no Alto Rio Doce. Após 60 km de percurso, encontra-se a cidade de Governador Valadares com a maior população ribeirinha do Rio Doce (superior à 250 mil habitantes). O Rio Corrente Grande, situado entre Naque e Governador Valadares, foi o local selecionado como Referência deste estudo pelo reduzido impacto ambiental, sendo pertencente à Unidade de Conservação do Parque Estadual do Rio Corrente.

Figura 4. Locais de amostragem do Baixo Rio Doce: Aimorés, Colatina e Linhares em ES



FONTE: A AUTORA, 2019.

A partir de Aimorés a atividade agrícola e pecuária se intensifica, havendo também o impacto do despejo de efluentes domésticos das cidades de porte médio do ES, Colatina e Linhares (populações maiores que 100 mil habitantes)

Coleta dos tecidos alvos dos peixes adultos

Neste estudo foram coletados três grupos de peixes, pertencentes a nichos tróficos distintos (Figura 5): i) lambari (*Astyanax lacustris*, Characidae); ii) siluriformes ou “bagres” (jundiá, *Rhamdia quelen*, Heptapteridae; e mandi, *Pimelodus maculatus*, Pimelodidae e a cumbaca, *Trachelyopterus striatulus*, Auchenipteridae); iii) cascudos (cascudo viola, *Loricariichthys castaneus*, Loricariidae; cascudo, *Hypostomus affinis*, Loricariidae).

Figura 5. Peixes coletados em 2019 ao longo do Rio Doce



FONTE: A AUTORA, 2019.

Com o auxílio dos pescadores do Rio Doce, os peixes foram coletados utilizando os seguintes materiais: i) redes de emalhar (malhas 3, 4, 5, 6, 7, 8 cm); ii) armadilhas do tipo covo; iii) redes de arrasto (10m e 20m); iv) tarrafas; v) linha e anzol e; vi) embarcações de pequeno porte para a maioria dos locais (Figura 6). Para cada local de coleta foi feito um esforço amostral semelhante, permanecendo até 2 dias para a obtenção dos peixes.

Figura 6. Material e técnicas de pesca para a captura dos peixes ao longo do Rio Doce em 2019



FONTE: A AUTORA, 2019.

A-D - Redes de emalhar; E- armadilhas do tipo covo; F - tarrafas

Os peixes capturados foram mantidos em caixas térmicas sob aeração constante (Figura 7) e transportados (duração máxima de 30 min) até um local apropriado para a coleta das amostras biológicas (sangue, fígado, gônadas, brânquias, cérebro e músculo, Figura 8). A sedação dos animais foi feita com o uso do anestésico benzocaína 0,02% (p-aminobenzoato de etila em etanol PA a 200 mg/L) e em seguida os peixes foram medidos e pesados para obtenção do Fator de Condição. O sangue foi coletado da veia caudal com seringas heparinizadas (para peixes de maiores portes, como os bagres), e com capilares através da punção cardíaca (peixes de menor porte, como os lambaris), sendo realizado

um esfregaço sanguíneo para análises de genotoxicidade (micronúcleo). Já para as análises moleculares, o plasma foi obtido após centrifugação à 4000g por 2 min (apenas dos peixes de maior porte) à temperatura ambiente e o sobrenadante foi aliquoteado em tubos contendo solução antiproteolítica 100 mM de PMSF (1:10, Sigma Aldrich®) e armazenado em nitrogênio líquido a -75° C. Posteriormente, os peixes foram sacrificados com secção vertebral, e dissecados com auxílio de pinças e tesouras para remoção do fígado, gônadas, cérebro e músculo, os quais foram mantidos a -75° C em nitrogênio líquido até serem transportados para o Freezer -80° C, para posteriores análises bioquímicas e moleculares. Fígado e gônadas foram pesados para o cálculo dos índices somáticos (o peso e comprimento total do peixe foram obtidos antes da coleta do sangue). Outra parte do material de fígado, gônadas e brânquias foi fixada quimicamente para análises histopatológicas.

O material biológico foi coletado próximo do local de captura dos peixes para evitar o estresse do transporte, e posteriormente foi transportado e analisado (biomarcadores) com uso da infraestrutura presente no Instituto de Biociências da UNESP (CLP), Instituto de Estudos Avançados do Mar da UNESP (IEMar-UNESP) e outras instituições colaboradoras (UFPR e UTFPR).

Figura 7. Manutenção dos peixes vivos em caixa térmica sob aeração constante para a coleta de amostras biológicas.



FONTE: A AUTORA, 2019.

À medida que eram capturados no rio, os peixes eram mantidos sob aeração com o uso bombas compressoras à pilha e após serem transportados ao local de coleta das amostras, eram substituídos por compressores de maior potência.

Figura 8. Procedimentos para a coleta das amostras dos peixes do Rio Doce.



FONTE: A AUTORA, 2019.

Após a anestesia dos peixes, verificada através da redução da movimentação e a perda de equilíbrio, os peixes eram pesados e medidos. Após remoção do sangue o peixe era sacrificado e os demais órgãos eram dissecados e separados para as análises.

Análises dos parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água do Rio Doce: Clorofila a ($\mu\text{g/L}$), Cianobactérias ($\mu\text{g/L}$), Condutividade ($\mu\text{S/cm}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), turbidez (NTU), oxigênio dissolvido (mg/L), pH e precipitação média (mm), foram obtidos através de uma compilação dos dados fornecidos em relatórios semanais e mensais da Fundação Renova no mesmo período das coletas de verão (Jan-Fev) e inverno (Jul-Ago) de 2019. Para o período do verão foram considerados os dados fornecidos em 7 boletins semanais de 14/01 a 25/02, enquanto para o inverno foi feita a média dos dados fornecidos pelos três boletins mensais de Julho, Agosto e Setembro de 2019. O monitoramento automático foi feito através de equipamentos fixos ao longo da bacia do Rio Doce, fornecendo os dados dos parâmetros quali-quantitativos da água (PMQQS).

(<https://www.fundacaorenova.org/arquivos-e-relatorios>)

Análises químicas dos metais e dos contaminantes orgânicos

Análises químicas na água

Amostras de água (1 L por ponto em triplicata) foram coletadas pontualmente a 30 cm da superfície, no mesmo local de coleta dos peixes. Para as análises químicas dos metais (As, Al, Cd, Cr, Cu, Hg, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) as amostras foram acidificadas com 0,5% de HNO_3 e foram armazenadas em garrafas de polipropileno mantidas refrigeradas e na ausência de luz. As amostras foram filtradas com membrana PTFE de poro 0,45 μm (Merck MilliporeTM) (Figura 9), analisadas em triplicatas e expressas em $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ou mg.L^{-1}) e comparadas com a Resolução CONAMA 357/2005, de acordo com a classe de água no local em que a amostra foi coletada.

A análise química dos compostos orgânicos persistentes (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) foi feita de acordo com (Cavalcante et al., 2007) onde as amostras de água coletadas (1 L por ponto em triplicata) foram armazenadas em garrafas de vidro âmbar e mantidas refrigeradas na ausência de luz. Os compostos foram extraídos das amostras de água previamente filtradas (membrana PTFE de poro 0,45 μm , Merck MilliporeTM) através da extração de fase sólida com cartucho SPE C18 (Discovery ® DSC-18 SPE, 0,5g/6 ml) acoplado a um sistema de vácuo manifold (VisiprepTM). As colunas foram condicionadas com água miliq, em um fluxo de aproximadamente 5

ml/min e os compostos eluídos com 0,5 ml de acetona, 0,5 ml de acetato de etila, 0,5 ml de hexano e por último 0,5 ml da mistura dos três solventes em iguais proporções (Figura 9). Esta etapa ainda não havia sido concluída, pois embora as extrações tenham sido concluídas, restava ainda a análise dos extratos. A detecção dos contaminantes persistentes permaneceu a ser realizada, com o uso de GC-MS/MS e HPLC-DAD, no Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, coordenado pelo Prof. Rivelino Cavalcante.

Figura 9. Procedimentos para a extração das amostras de água e sedimento para as análises químicas de metais e compostos orgânicos.



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Filtração das amostras de água com membrana PTFE de poro 0,45 μm . B – Digestão ácida das amostras de sedimento para análises químicas de metais. C e D – Extração dos compostos orgânicos da água por SPE C18.

Sedimentologia

As amostras de sedimento foram coletadas com o uso de pás, a 5 m de distância da margem e profundidade a partir de 30 cm, e armazenadas em frascos de polietileno brancos fosco para a análise de metais e em recipientes de alumínio para a análise de orgânicos, e mantidos a 4° C até as análises.

Granulometria

As análises de composição e distribuição granulométrica do sedimento foram realizadas de acordo com as normas propostas pela CETESB (L6.160). Uma fração da amostra (limite de 120g para cada ponto) de sedimento liofilizado foi separado e pesado (Figura 10). Em seguida, as amostras pesadas foram submetidas a um peneiramento úmido (água destilada) em malha de 0,062 mm para a retirada de fração lamosa, sendo subsequentemente recolocado em estufa por 2 dias na mesma temperatura de 60°C. Depois de seco, com o auxílio de um almofariz e pistilo, a amostra foi amassada e o material peneirado por 20 minutos em agitador de peneiras eletromagnético (Bertel), utilizando-se o jogo de peneiras de 6 peças por 20 minutos. A fração retirada em cada peneira foi pesada e registrada, e com os resultados obtidos foi possível determinar os teores de areia, silte e argila, segundo a classificação de (Wentworth, 1922), assim como as classificações granulométricas de acordo com Shepard (1954).

Figura 10. Análise de granulometria do sedimento do Rio Doce



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Pesagem das amostras desidratadas. B – Agitador de peneiras eletromagnético para a análise de granulometria.

Análises químicas do sedimento

Matéria orgânica

A composição da matéria orgânica foi determinada via metodologia da oxidação da matéria orgânica via úmida de acordo com Walkley & Black (1934) modificado como

proposto por Camargo et al., (2009). Cada grama do sedimento liofilizado foi oxidado com 10 ml $K_2Cr_2O_7$ 1N em presença de 20 ml H_2SO_4 PA. Após leve agitação e repouso por 30 min, foi adicionado 200 ml de água destilada, 10 ml de ácido ortofosfórico PA e 1 ml de difenilamina 1%. O excesso de dicromato remanescente da oxidação foi titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal (SFA) 0,5N e o teor de matéria orgânica foi calculado com base no volume de SFA adicionado na titulação (Figura 11). Uma amostra sem a adição do sedimento foi utilizada como branco para comparação com as amostras.

Análise química dos metais

Os mesmos metais e os compostos orgânicos analisados na água permaneceram a serem quantificados na fração total do sedimento (triplicata por amostra), bem como na água intersticial, permitindo estimar a biodisponibilidade dos elementos por diferentes vias (contato dérmico – elementos dissolvidos / ingestão – sedimento integral).

Para as análises de bioacumulação, amostras de músculo, fígado e brânquias dos peixes coletados foram armazenadas em um pool de 15 a 20 indivíduos por espécie e por grupo, a $-75^\circ C$, e analisadas em triplicata de acordo com Cotta et. al. (2006). Após desidratação por liofilização, as amostras de material biológico e de sedimento serão digeridas em ácido nítrico (US EPA 3050B), e a detecção dos metais será realizada com Espectrofotômetro de Absorção Atômica (FAAS, Varian, AA 240FS). As concentrações dos metais nas amostras dos tecidos serão expressas em $\mu g.g^{-1}$ de peso úmido (pesagem das amostras antes do congelamento) ou seco (pesagem após desidratação), com análise de relação entre peso seco e úmido para estimar o risco toxicológico à saúde humana, de acordo com a CETESB. Os dados obtidos poderão auxiliar na tomada de decisões das autoridades públicas no âmbito sócio-econômico e de saúde pública.

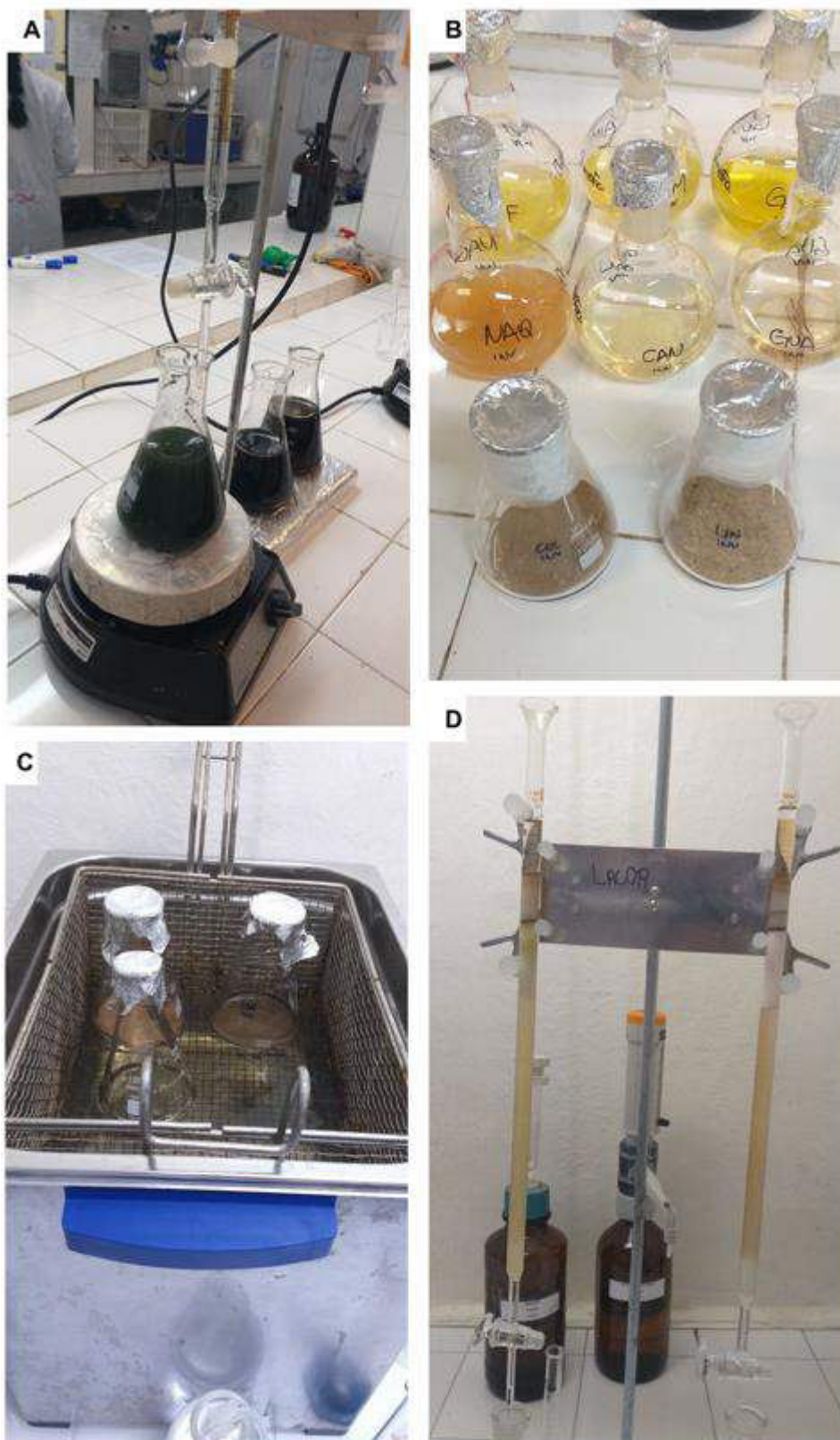
Análise química dos contaminantes orgânicos

Os contaminantes orgânicos persistentes (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), agrotóxicos (organofosforados e organoclorados) e alguns contaminantes emergentes (estradiol, etinilestradiol, estrona) estavam sendo analisados pelo Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos (LACOR – UFC) para verificar a influência da poluição oriunda das indústrias, atividades de agropecuária e efluentes domésticos, já

que o trecho afetado da bacia atravessa várias cidades e recebe suas contribuições, em termos de poluição doméstica, o que pode agravar eventuais efeitos relacionados com os resíduos de mineração.

A extração dos contaminantes orgânicos foi feita de acordo com Cavalcante et al., 2008, consistindo em duas etapas, a primeira com extração de contaminantes orgânicos totais seguida de clean-up para separação em três frações com distintas polaridades (Figura 11). Na primeira etapa, 15g do sedimento liofilizado foram transferidos para um erlenmeyer, onde foram adicionados padrões surrogates (50uL de cada) e solventes extratores (25 ml de cada solvente Acetona, Acetato de etila, Diclorometano, Hexano, e a mistura dos quatro solventes em iguais proporções), sendo que a cada adição de um solvente a amostra permaneceu 20 min no ultrassom, seguida da transferência para tubos falcon de vidro e centrifugadas a 4000 rpm 'pr 15 min. Os 125 ml da mistura extratora foram transferidos para balões de fundo chato e pré-concentrados para 1 ml em rotaevaporador. O procedimento de *clean up* consistiu na separação dos compostos através de cromatografia por afinidade com uma coluna de Sílica, cobre, alumina e sulfato de sódio, através da adição de 40 ml de Hexano (Fração 1), 60 ml de Hexano: Diclorometano: Acetato de etila (3:3:1 – Fração 2) e 50 ml de Diclorometano:Metanol (9:1 – Fração 3). Os extratos foram concentrados em balão rotaevaporador e armazenados em vials âmbar mantidos a -20° C até as análises.

Figura 11. Análises químicas do sedimento do Rio Doce



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Titulação com SFA para medir o teor de matéria orgânica do sedimento. B – Extração dos contaminantes orgânicos totais. C – Permanência das amostras no ultrassom como etapa para auxiliar no processo de extração; D – Extração dos contaminantes orgânicos em frações, por clean-up (Cromatografia de adsorção)

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na bile

A concentração de metabólitos de HPAs na bile permaneceu a ser determinada de acordo com o método proposto por Hanson & Larson, 2008, com modificações. A bile foi coletada em pools de 3 a 5 indivíduos e armazenadas em frascos âmbar a -80° C. As amostras permaneceram a serem diluídas em Metanol 48% (1:1000) e plaqueadas (200 µl) em placas pretas. A leitura da fluorescência permaneceu a ser realizada de acordo com o número de anéis do HPA (2 anéis a 6 anéis de 288 a 422 nm) no leitor de microplaca TECAN Infinity® 200 Pro.

BIOMARCADORES

Antes da coleta do plasma, o peso e comprimento total dos peixes foram obtidos para cálculo do Fator de Condição de Fulton (K_F): $K_F = (W / L^3) \times 100$.

W = Peso corporal em gramas

L = Comprimento corporal total em centímetros

Para verificar a relação entre o peso do fígado ou da gônada e o peso corporal total de cada indivíduo foi realizado um cálculo do índice hepatossomático (IHPS) e do gonadossomático (IGS). Estes biomarcadores somáticos podem indicar uma alteração no peso relativo do órgão que pode ser comparável com o de outro indivíduo. O índice hepatossomático (IHS) foi calculado a partir da fórmula: $IHS = (P_{\text{Fígado}} / P_{\text{Peixe}}) \times 100$

Da mesma forma, o índice gonadossomático (IGS) de cada indivíduo foi determinado segundo a fórmula: $IGS = (P_{\text{Gônada}} / P_{\text{Peixe}}) \times 100$

Foram comparados os IGS entre indivíduos de cada sexo, já que os pesos médios entre as gônadas dos machos e fêmeas variam muito.

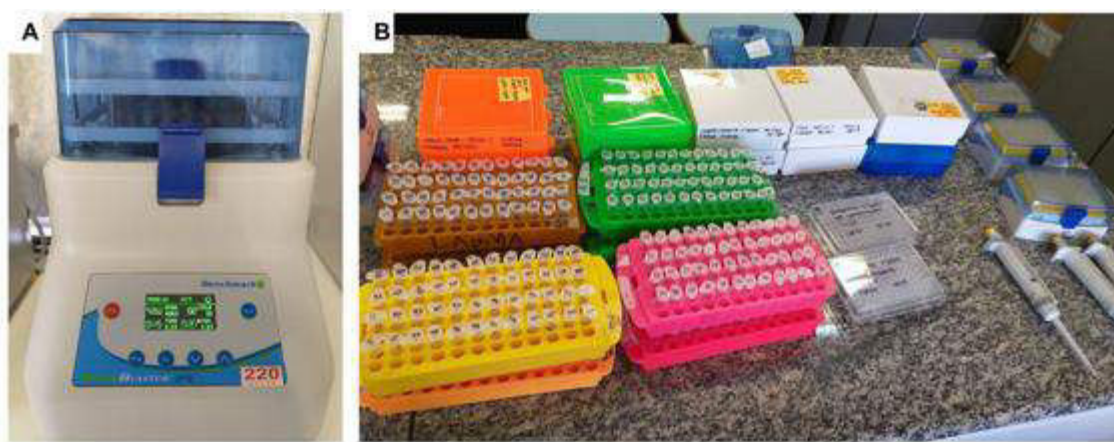
Análises Bioquímicas

As amostras de fígado foram descongeladas e fragmentos de aproximadamente 100 mg de tecido foram homogeneizados (Desagregador de células Benchmark) em tampão Tris HCl 20mM, EDTA 0,1M, PMSF 1mM pH 7,4 (1:10) (Figura 12). Para o

músculo e cérebro as amostras foram homogeneizadas em Tampão Fosfato 0,1M, pH 7,5. Em seguida foram centrifugadas numa velocidade de rotação de 12.000 g, a 4° C durante 30 minutos. As concentrações de proteínas totais das alíquotas de plasma, fígado, gônadas, músculo e cérebro foram determinadas para normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos (BRADFORD, 1976). Na microplaca foram adicionados 10 µL do sobrenadante de cada amostra diluída em seu respectivo tampão, seguidos de 190 µL do reativo de *Bradford*® (*Coomassie brilliant blue*, Sigma Aldrich). Para o branco foi adicionado apenas solução tampão. Foram empregadas duas réplicas de cada amostra e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm. Para cada grupo ou local de coleta, foram analisados de 3 a 20 indivíduos por espécie de peixe de acordo com o número amostral obtido.

Para as amostras de fígado foram realizadas as análises: LPO, Danos no DNA, GST e GSH. Já no cérebro: LPO, Danos no DNA e AChE, nas gônadas: Danos no DNA e LPO e no músculo somente AChE.

Figura 12. Análises bioquímicas das amostras dos peixes do Rio Doce



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Desagregador de células Benchmark que permite a homogeneização de 24 amostras simultaneamente. B – Materiais plástico utilizados nas análises bioquímicas (micropipetas, ponteiras, microtubos, microplacas e suportes de microtubos)

Peroxidação de lipídios (LPO)

Os danos causados nos lipídios foram avaliados de acordo com o Método FOX (JIANG et al., 1991, 1992). O princípio do método se baseia na reação dos produtos finais da peroxidação lipídica (malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular)

com o ácido tiobarbitúrico (TBA), após acidificação e aquecimento, formam complexos colorimétricos, que consistem nas bases de Schiff, e podem ser determinados espectrofotometricamente. A cada 150 ml de amostra homogeneizada não centrifugada foram adicionados 300 µL de ácido tricloroacético 10% e 150 µL de TBA 0,67%. As amostras foram incubadas a 70° C por 10 min, e em seguida 200 µL foram pipetados em duplicata em placas pretas e a fluorescência foi determinada a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão em leitor fluorímetro. Para o cálculo da concentração de peróxidos lipídicos foi utilizada uma curva padrão de uma solução de tetrametoxipropano (TMP, Sigma Aldrich) a 0,001% diluído nas concentrações de 0,6; 1,5; 3; 4; 6 e 10 mM.

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com a formação de um tioéter a partir da reação do substrato CNDB com o GSH, catalisada pela GST (KEEN et al., 1976 com modificações). Na microplaca foram adicionados 20 µL de amostra, acrescidos de 180 µL do meio de reação com uma pipeta multicanal. O meio de reação foi preparado a partir de tampão fosfato a 0,1M pH 6,5; solução de GSH a 3mM (Sigma Aldrich) e solução de CDNB a 3mM (Sigma Aldrich). A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 340 nm durante 2 min em intervalos de 12 segundos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o delta absorbância no intervalo de 1 minuto.

Glutathione reduzida (GSH)

A concentração de Glutathione reduzida (GSH) foi determinada a partir da reação com o DTNB 2,5 mM (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico). Para precipitação das proteínas das amostras, foi adicionado TCA (ácido tricloroacético) para chegar a uma concentração final 10%. A mistura foi centrifugada e 50 µl do sobrenadante foi pipetado na microplaca seguido de 230 µl de tampão tris-base a 0,4M, pH8,9 e 20 µL de DTNB 2,5mM. A leitura foi realizada a 415 nm e o cálculo foi feito através da equação linear obtida pela curva padrão da GSH (Sigma aldrich) nas concentrações de 160 a 5 µM (diluição seriada).

Acetilcolinesterase (AChE)

Para avaliar a atividade da AChE foi utilizado o método de ELLMAN et al. (1961) que tem como princípio a hidrólise do substrato acetiltiocolina pela AChE, em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato responsável pelo aparecimento de coloração amarela que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 405 nm. Amostras de músculo e cérebro foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato pH 7,5. Após a quantificação de proteínas totais das amostras, estas foram diluídas a 1mg proteínas totais .ml⁻¹. Em uma microplaca foram adicionados 20 µL da amostra em duplicata e com uma pipeta multicanal, 130 µL de DTNB 0,75 mM, seguido de 50 µL de iodeto de acetiltiocolina a 9 mM . A leitura foi realizada a 405 nm durante 5 minutos em intervalos de 50 segundos.

Análises de Genotoxicidade

Danos no DNA por Precipitação alcalina

As quebras nas fitas de DNA (*single and double strand breaks*) decorrentes da exposição aos xenobióticos podem ser quantificadas indiretamente pelo método de precipitação alcalina proposto por Olive (1988), modificado de acordo com Gagné e Blaise, 1995.

Para tanto, em 25 µL da amostra homogeneizada não centrifugada foram adicionados 200 µL de SDS 2% (Tampão 10mM Tris, 10mM EDTA, 40mM NaOH) para o rompimento das membranas celulares (nuclear), seguido do acréscimo de 200 µL de KCl a 0,12M para a precipitação do DNA integro associado às proteínas (cromatina). A reação foi acelerada com a incubação da amostra a 60° C por 10 min seguido de um choque térmico a 4° C por 30 min. A amostra foi centrifugada a 8000g por 5 min e 50 µL do sobrenadante foi pipetado em microplaca preta com a adição de 150 µL do Reativo de Hoechst (1 µL/ml em tampão colato de sódio 4mM, NaCl 0,4M e trizma-acetato 0,1M pH 8,5. A fluorescência foi quantificada em leitor fluorímetro com excitação de 360 nm e emissão de 460 nm. O cálculo da concentração de DNA na amostra foi realizado com base na curva padrão obtida em concentrações do DNA de esperma de Salmão (Sigma Aldrich) que variaram de 5 a 200 µg/ml (Tampão 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0).

Teste de Micronúcleo Písceo

A frequência de micronúcleos em eritrócitos foi determinada segundo a técnica descrita por Heddle (1973) para a montagem das lâminas. Com o sangue retirado da veia caudal foi realizado um esfregaço numa lâmina de vidro limpa posteriormente fixada com etanol PA por 30 minutos, e corado com laranja de acridina. Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe em um aumento de 1000x no microscópio de epifluorescência. Além dos micronúcleos foram contabilizadas as alterações morfológicas nucleares segundo Carrasco et al. (1990) e a frequência de eritrócitos policromáticos segundo Ueda et al. (1992).

Análises Moleculares

Expressão da Vitelogenina

Separação eletroforética das proteínas do plasma

Para realizar o preparo da amostra, a concentração de proteínas do plasma foi determinada através do método de Bradford (1976). As proteínas foram reduzidas e desnaturadas com tampão de amostra redutor (Tris HCl 1M pH 6,8, SDS, Glicerol, Azul de bromofenol e β mercapto-etanol). Foram aplicados no gel 60 mg de proteínas por amostra, correspondendo a um volume de 15mL. As proteínas do plasma foram separadas de acordo com o tamanho através da corrida eletroforética em mini-gel de poliacrilamida 4% para gel de empilhamento e 8% para separação com aplicação de campo elétrico vertical. Foi utilizado tampão de corrida para SDS-PAGE (Tris base 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%) e a velocidade foi ajustada para 20 mA por gel com voltagem variada. Foram utilizados marcadores de massa molecular (Rainbow BioRad®) para monitoramento do perfil eletroforético da vitelogenina.

Para permitir a visualização das bandas formadas após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com Comassie Blue (R250) permanecendo *overnight* no *biomixer*. O gel foi lavado com DESTAIN (metanol 50% + ácido acético glacial 15%) para retirar o excesso de corante.

Western blotting

As proteínas do gel de poliacrilamida separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad®: poro de 0,45 µm) em uma cuba contendo tampão de transferência (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,037%, metanol 20%). A velocidade da corrida foi ajustada para 100 V, com amperagem variada, durante 60 minutos. Para verificar se as proteínas do gel foram transferidas para a membrana, esta foi corada com corante Ponceau (diluído em ácido acético 1%). Após a lavagem da membrana, para retirada do corante, esta foi bloqueada com leite sem gordura 5% (Molico) em solução de TBS-T (20mM Tris pH 7.4, 120mM NaCl e 0.05% Tween 20) por 1 hora. A membrana foi incubada com anticorpo antivitelogenina (primário) de *Rhamdia quelen* (MOURA COSTA, 2009) para as amostras de jundiá, enquanto para as amostras de mandi (*P. maculatus*) foi utilizado antisoro de *Geophagus brasiliensis* (YAMAMOTO et al., 2017) sob agitação constante por 16 horas a 4° C, numa diluição de 1:3.000 e 1:5.000, respectivamente. As concentrações e reações dos anticorpos com as respectivas amostras foram previamente testadas para a determinação de uma reação sensível e específica para cada tipo de amostra. Após a incubação *overnight*, a membrana foi lavada com TBST 3 vezes para a remoção dos anticorpos primários não ligados. A membrana foi, então, incubada com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase (Sigma) por 1 hora numa diluição de 1:4000. A proteína foi visualizada através de um substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana exposta a um filme de raio-X sensível (Amersham biosence) em um intervalo de até 30 minutos.

ELISA competitivo

Para uma detecção quantitativa mais sensível da vitelogenina plasmática, foi realizada a técnica de ELISA por competição de acordo com Yamamoto et al. (2017). O princípio da técnica consiste na competição pela ligação do anticorpo primário entre a vitelogenina purificada que está fixada na placa e a vitelogenina da amostra que foi incubada com o anticorpo *overnight*. Quanto maior a concentração de vitelogenina na amostra (a ser verificada) maior a quantidade de ligações com o anticorpo primário (os quais ficaram incubados *overnight*). Desta forma haverá menos anticorpos livres (ou disponíveis) para ligação com a vitelogenina fixada na placa. Portanto menos anticorpos primários se ligarão, assim como os secundários, e

a reação será menos intensa. A reação é inversamente proporcional à concentração de vitelogenina na amostra.

Inicialmente foi necessário testar qual a melhor diluição do anticorpo (1:1.000 - 1:50.000) e a quantidade da vitelogenina purificada aderida na microplaca (10, 20 e 40 ng/poço). Para este ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 poços (base sólida, NUNC MAXISORP) revestidos com 100 µl de 40 ng de vitelogenina purificada (melhor concentração testada) por poço em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubados overnight a 4° C. Para determinação de ligações não específicas foi adicionado um branco correspondente a 100 µl de tampão apenas. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem PBST (PBS pH 7,4 e Tween 20 0,05%) e os espaços vazios foram bloqueados com 200 µl de BSA 1% por 2 horas em temperatura ambiente. Aliquotas de 100µl das amostras de plasma diluídas previamente incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo anti-vitelogenina recombinante (1:5.000) produzido pelo Laboratório de Toxicologia Celular (UFPR), e foram pipetadas em duplicata na placa. Para a curva padrão foram realizadas diluições das amostras de vitelogenina recombinante purificada em concentrações conhecidas (15 a 1000 ng de vtg/poço). Após 3 h de incubação, sob agitação constante em agitador orbital em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST. Foram adicionados 100 µl de anticorpo de cabra anti-rabbit conjugado dextran-HRP (BioRad®, 1:4000) diluídos em PBST e incubados por 1 hora e m temperatura ambiente. Após a lavagem foram adicionados 100 µl do substrato cromógeno (30 ml de tampão citrato 0,1M pH5,0, 15 mg o-Phenylenediamine (Sigma Aldrich), 15 µl H₂O₂) com uma pipeta multicanal. Depois de 15 minutos de reação no escuro, foram adicionados 30 µl de H₂SO₄ 1M para parada da reação, e em seguida as placas foram lidas a 490 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Para o cálculo, a absorbância média foi descontada do valor “branco” (ligações inespecíficas) e dividida pelo zero (ligação máxima do anticorpo) para determinação da porcentagem de ligação de cada amostra. Foi plotada uma curva padrão onde os valores foram convertidos logaritmicamente para obtenção de uma regressão linear.

Hormônios esteroides

As concentrações de 17 β -estradiol no plasma dos indivíduos de ambos os sexos (10 indivíduos por sexo, por espécie e por grupo) foram determinadas através do ensaio de ELISA competitivo de acordo com Brown et al. (2003). Primeiramente, os hormônios esteroides foram extraídos através da adição do solvente éter etílico. Para cada 100 μ L de plasma foram adicionados 1000 μ L de éter etílico PA (Synth), misturados em vórtex por 1 min e congelados instantaneamente em gelo seco. A fração líquida do solvente contendo os hormônios esteroides foi aliquoteada em outro microtubo e evaporada à temperatura ambiente dentro da capela com exaustor ligado. Os hormônios aderidos no microtubo foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4. Neste teste a coloração resultante da reação enzima-substrato é inversamente proporcional à presença do antígeno, já que esta é medida baseada na interação competitiva entre o hormônio-enzima conjugado e o estradiol por um número limitado de anticorpos.

Para a realização dos ensaios, microplacas (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp) foram cobertas com 50 μ L de anticorpo anti-17 β estradiol (policlonal R0008; Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA, diluído 1:10.000). Após a pipetagem, as placas foram acondicionadas a 4°C, por pelo menos 12 horas. A curva padrão para cada ensaio foi preparada a partir de estradiol (E8875, Sigma-Aldrich) na concentração 25.000 pg/mL, considerado o padrão mais alto. A curva foi diluída 1:1, de forma seriada, com solução de ensaio de ELISA (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; BSA; pH ajustado para 7,00) oito vezes até chegar nas concentrações de 195 pg/mL, considerado o padrão mais baixo.

O hormônio conjugado estradiol-HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) foi diluído 1: 50.000 e mantidos em 4°C até o momento dos ensaios. A solução do substrato enzimático foi preparada imediatamente antes de sua adição na microplaca e consistia de H₂O₂ a 0,5M; ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; pH ajustado para 4,00).

Ensaio de dosagem:

A microplaca já coberta com anticorpos foi lavada por cinco vezes com solução de lavagem de ELISA (NaCl; Tween 20) e o excesso de solução foi retirado batendo-se a placa em papel toalha. Foram pipetados 50 µL de solução de ensaio de ELISA (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; BSA; pH ajustado para 7,00) e as placas foram incubadas durante seis horas, em temperatura ambiente, com agitação suave em agitador Multi-Pulse Vortexer (modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®), sem pulso e em 200 rpm. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas e preparadas para o ensaio propriamente dito. Foram pipetados 20 µL das soluções dos padrões, 20 µL das soluções dos controles e das amostras, todos em duplicatas, e 50 µL da solução do marcado enzimático estradiol – HRP em todos os poços, exceto nos poços considerados como branco.

A microplaca foi incubada durante duas horas, em temperatura ambiente, com agitação suave em agitador Multi-Pulse Vortexer (modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®), sem pulso e em 200 rpm. Todo o processo de pipetagem levou, em média, 6 minutos, não ultrapassando 10 minutos. Após a incubação, a microplaca foi lavada novamente e foram adicionados 100 µL da solução do substrato enzimático em cada poço, exceto nos poços considerados como branco.

A microplaca foi agitada moderadamente em agitador Multi-Pulse Vortexer (modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®), sem pulso e em 300 rpm até que os poços considerados como zeros chegassem em densidade óptica (OD) entre 0,7 e 1,0; quando foi feita a leitura da absorbância em 405 nm, no leitor de microplaca TECAN Infinity® 200 Pro. Para os cálculos foram utilizadas planilhas do programa Excel e do programa de estatística Prism GraphPad 8.3.1.

Análises Histopatológicas

Microscopia de luz

As gônadas e fígados coletados para histopatologia foram fixadas em ALFAC (etanol 85%, formol 10% e ácido acético 5%) por 16 h e depois transferidos para Álcool 70%, onde permaneceram até o procedimento de inclusão. Para esta etapa, os órgãos foram desidratados em série crescente de etanol, transferidos para o xilol e paraplast plus (Sigma Aldrich) e em seguida emblocados. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos através de Micrótomo Leica e distendidos nas lâminas com solução de albumina 20%. As lâminas foram coradas em Hematoxilina/Eosina e montadas com Entellan (Merck®). O material foi analisado de acordo com uma metodologia proposta por Leino et al., para as gônadas (2005) e Bernet et al., para o fígado (1999), com modificações e as imagens registradas em uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz. Foram analisados 15 (ou pelo menos 3) a 20 indivíduos por espécie e por grupo.

As principais alterações avaliadas no fígado foram: necroses; infiltração leucocitária; vacuolização; neoplasia; diferenciação tecidual e parasitas. Para cada alteração foi atribuído um fator de importância (w) que varia de 1 a 3 (TABELA 2). A relevância de uma lesão depende de sua importância patológica, ou seja, como ela afeta a função do órgão: 1- Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante é cessada; 2- Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos se o estressor é neutralizado; 3- Importância patológica marcada, a lesão geralmente é irreversível, levando a perda parcial ou total da função do órgão. Cada lâmina analisada recebeu um índice de lesão que representa o somatório do valor obtido em cada alteração encontrada. Para atribuir um valor para cada alteração é necessário multiplicar o fator de importância da alteração (w) pelo valor de pontuação que varia de 0 a 6 de acordo com o grau de extensão da alteração.

TABELA 2 - Fator de importância e valor de pontuação atribuídos para cada lesão

	Hemorragia	Infiltração leucocitária	Vacuolização	CMM	Necrose	Neoplasia	Parasitas
Fator de importância	1	2	2	2	3	3	1
	Sem alteração	Leve ocorrência	Ocorrência moderada	Ocorrência severa			
Ocorrência	0	2	4	6			

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise das alterações nas brânquias foi selecionado o segundo arco branquial do lado esquerdo, o qual foi previamente lavado em solução tampão PBS pH 7,4 antes da fixação em solução Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4%, Fosfato de Sódio 0,1M pH 7,4) por pelo menos 24h. As amostras mantidas refrigeradas até seu processamento, foram lavadas em tampão fosfato 0,1M duas vezes e desidratadas em série crescente de etanol (Merck®) por 10 min em Álcool 70%, 80%, 90% e 100%I; 100%II. Em seguida as brânquias foram submetidas ao ponto crítico (CO₂) e metalizadas com ouro (Figura 13). Posteriormente, analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electron Microscope) JEOL JSM – 6360LV do centro de Microscopia eletrônica da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR).

Figura 13. Equipamentos para processamento das amostras para a microscopia eletrônica de varredura.



Equipamento Secador para desidratação das amostras através do ponto crítico (Bal-tec CPD 030) e metalização com ouro (Bal-tec SCD 030).

Embriotoxicidade

O teste de toxicidade aguda em embriões de *Rhamdia quelen* foi realizado de acordo com as normas propostas pela OECD (Teste 236, 2013), modificado para análise da toxicidade do elutriato do Rio Doce de acordo com Bartzke et al. (2010). Para obtenção dos embriões de *Rhamdia quelen*, em Março de 2019, exemplares adultos machos e fêmeas de jundiá foram induzidos à reprodução na piscicultura Panamá (Paulo Lopes, SC) através de 2 inoculações de extrato de hipófise de carpa nas fêmeas (5,5 mg/kg de peixe) com um intervalo de 12 h (Figura 14). As doses foram calculadas de acordo com a massa de cada indivíduo e o momento da desova foi calculado considerando a temperatura ambiente para o somatório das horas grau ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$). Para a desova o ventre foi pressionado para a liberação dos gametas, os quais foram misturados em meio seco para a fertilização seguida de hidratação. Os embriões viáveis no estágio de gástrula (a partir de 6 horas pós-fertilização) de *Rhamdia quelen* obtidos na piscicultura Panamá (Paulo Lopes, SC) foram transportados imediatamente em sacos com oxigênio até a Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR, Campus Curitiba). No laboratório estes foram transferidos individualmente para placas de 96 poços (1 indivíduo por poço) contendo 200 μL de soluções de elutriato das amostras do Rio Doce previamente preparadas (sedimento e água na proporção 1:4, misturados por agitação durante 1h, decantação de 20h e centrifugação a 3000rpm por 20 min) (Figura 15) em quaduplicata (4 placas para cada grupo). Para o grupo controle negativo, os embriões foram expostos apenas à água reconstituída (6,5 mg de CaCl_2/L ; 133,5 mg MgSO_4/L ; 0,4 mg KCl/L ; 10,5 mg NaHCO_3/L , ASTM, 1993), e um grupo controle positivo (ZnCl_2 100 mg/L e 10 mg/L) foi utilizado para confirmação da sensibilidade dos embriões. Foi feita a troca parcial (100 μL , 1/2) da água ou solução elutriato a cada 24h (sistema semi-estático) e as placas foram mantidas na incubadora a 24°C , por um período de até 96h (Figura 16). A cada 24 horas após a fertilização foi observada a letalidade dos embriões de acordo com os seguintes *endpoints*: coagulação dos ovos fertilizados; ausência da formação de somitos; ausência do desprendimento da cauda do saco vitelínico; ausência de batimentos cardíacos. Após este período de 96 h os embriões previamente anestesiados a -20°C foram coletados em 4 pools de aproximadamente 90 indivíduos para as análises bioquímicas (GST, GSH, LPO e AChE) de acordo com os protocolos já descritos. Aproximadamente 5 embriões de 48h, 72h e 10 de 96h para cada grupo foram anestesiados em solução alcóolica de Eugenol 50 mg/ml e fixados em solução Karnovsky

(Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4%, Fosfato de Sódio 0,1M pH 7,4) para análises de deformidades em estereomicroscópio (Leica). O índice de deformidades foi calculado através da soma dos scores das deformidades observadas (TABELA 3), de acordo com Powers et al. (2011). O teste foi validado de acordo com os critérios apontados pela OECD (2013).

TABELA 3. Índice de deformidades com as pontuações para cada deformidade observada, de acordo com Powers et al. (2011)

Deformity	Score
Axial (lordoses, kyphosis)	4
Damaged fins	2
Facial deformity (eyes absence, reduced barbells buccal and facial deformities)	4
Thorax/abdominal (Pericardial edema)	4

Figura 14. Indução da reprodução dos jundiás para obtenção dos embriões em Paulo Lopes, SC



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Piscicultura Panamá em Paulo Lopes, SC; B – Seleção das fêmeas para indução da desova; C – Desova dos gametas femininos; D – Fecundação à seco; E – Embriões transportados em saco plástico com oxigênio até o local do experimento, em Curitiba – PR.

Figura 15. Preparo das soluções de Elutriato das amostras do Rio Doce



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Pesagem do sedimento. B – Mistura da água e sedimento (4:1). C – Agitação em agitador magnético; D – Decantação do sedimento na geladeira; E e F – Centrifugação do Elutriato

Figura 16. Procedimentos para o teste de toxicidade com os embriões de jundiá expostos por 96hpf



FONTE: A AUTORA, 2019.

A – Adição das soluções de elutriato nas microplacas de 96 poços e a seleção dos embriões viáveis (seta branca). Note que os embriões viáveis apresentam coloração transparente enquanto os coagulados são mais opacos e brancos; B – Incubação dos embriões em estufa BOD sob temperatura e fotoperíodo constante; C – Visualização dos embriões viáveis e das deformidades a cada 24hpf; D – Coleta dos embriões em pool das amostras no final do experimento (96hpf) para as análises bioquímicas

Modelo Matemático

O modelo matemático, desenvolvido de acordo com Brito (2015) e Barrera (2013) baseado no indivíduo – *Individual Based Model* (IBM), será utilizado no presente estudo para uma avaliação da propagação dos efeitos dos poluentes na dinâmica populacional de

Rhamdia quelen. O programa criado com utilização da linguagem computacional Fortran – IBM *Mathematical Formula Translation System*, considera que embriões, larvas, juvenis e adultos de *Rhamdia quelen* em diferentes idades sejam explicitamente modelados e submetidos a eventos estocásticos, ao invés de equações determinísticas.

Os riscos de exposição a nível populacional foram baseados em três principais cenários hipotéticos: I – impacto dos poluentes apenas nos estágios embriões-larvas; II – impactos dos poluentes em ambas as fases larvais e juvenis; e III – impacto dos poluentes em ambas fases adultas e larvais.

Para desenvolvimento do modelo matemático foram considerados os dados obtidos experimentalmente, como a taxa de deformidades dos embriões e das larvas expostas (cenário I), assim como outros parâmetros obtidos na literatura (cenário II): taxas de sobrevivência dos juvenis devido à competição; capacidade de carreamento; taxa de mortalidade natural dos adultos; taxa do aumento de peso anual; inibição do crescimento constante; peso em um ano de idade; idade de reprodução máxima; taxa de fecundidade.

Projeto BEPE

Através de um projeto de estágio em nível de pós-doutorado no exterior (via BEPE) será possível realizar um experimento *in vivo* com embriões de jundiá (*Rhamdia quelen*) ou mandis (*Pimelodus maculatus*) expostos à uma mistura dos metais detectados nas mesmas concentrações, nos locais de estudo do Rio Doce, assim como dos extratos dos compostos orgânicos do sedimento para comparação entre os efeitos dos metais e contaminantes orgânicos. Após o teste as amostras obtidas serão transportadas para a Austrália (Griffith University) onde será avaliado o perfil lipidômico dos embriões, uma vez que engloba as análises de peroxidação lipídica (já que esta foi uma das respostas mais evidente dos peixes adultos) e dos hormônios esteroideogênicos (já que alguns machos estavam expressando a vitelogenina). Estas análises vão permitir uma investigação dos principais mecanismos moleculares desencadeados devido à exposição dos contaminantes e possivelmente diferenciar os efeitos entre os metais e os contaminantes orgânicos. Os dados obtidos serão comparados com os do teste anterior, exposto ao elutriato, para verificar as respostas induzidas entre as duas situações de exposição distintas.

Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados serão verificados quanto aos Outliers (Teste Grubb), homocedasticidade (Teste Bartlett) e normalidade (Teste Shapiro). Para os dados paramétricos será utilizado o teste *one way* ANOVA (Análise de Variância de uma Via) seguido do teste Tukey-Kramer, enquanto para os dados não-paramétricos será utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's com o software Graphpad Prism. Serão consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo *p* foi menor ou igual a 0.05 ($p \leq 0.05$). Análises de correlação entre as variáveis serão calculadas com o teste de Pearson (dados paramétricos) ou Spearman (dados não-paramétricos) de acordo com Mukaka, (2012) onde o coeficiente de correlação entre: ± 0 a 0,3 indica ausência de correlação; $\pm 0,3$ a 0,5 uma baixa correlação; entre $\pm 0,5$ a 0,7 uma correlação moderada e de 0,7 a 1 uma correlação forte. Os dados biológicos serão integrados através de PERMANOVA com aplicação de um Índice de respostas biológicas de acordo com Vieira et al. (2016), para verificar as associações entre as variáveis e contaminantes na água. Serão realizadas análises de regressões lineares entre os dados de cada contaminante no ambiente e no tecido dos peixes, assim como para as respostas biológicas x contaminação ambiental x bioacumulação, para compreensão dos efeitos dos contaminantes biodisponíveis nos peixes. Para integração dos resultados, serão utilizadas análises multivariadas (tais como análise de componentes principais – PCA; ordenações multidimensionais; análises fatoriais), as quais permitem analisar grandes quantidades de dados visualizar associações entre diferentes tipos de variáveis. Os tipos de análises serão definidos para os respectivos conjuntos de dados que corresponderão aos artigos, conforme descrito no início deste relatório.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Parâmetros físico-químicos água

Os rios da bacia Hidrográfica do Rio Doce se enquadram como corpos d'água de classe 2, de acordo com a Resolução do Conama 357/2005. Ou seja, suas águas devem ser destinadas ao abastecimento humano, após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário, irrigação, aquicultura e pesca. Considerando os dados fornecidos pelos Relatórios da Renova do verão e inverno de 2019, todos os parâmetros físico-químicos analisados (clorofila a, turbidez, O₂ e pH) em média, se enquadravam dentro dos limites legais estabelecidos pela legislação (TABELA 4), apenas os dados de turbidez ultrapassaram em algumas medições pontuais.

Mesmo que as estações de monitoramento da Renova não tenham coincidido exatamente com os mesmos locais de coleta neste estudo, foi possível estabelecer uma comparação para a maior parte dos locais analisados e estes forneceram um panorama da variação destes parâmetros ao longo do percurso do Rio Doce. De acordo com os dados, a estação RDO 05 é a que apresenta maiores níveis de clorofila a e cianobactérias na água, mesmo estando dentro dos limites legais estabelecidos pelo Conama. Esta região fica próxima do polo industrial do Médio Rio Doce, especificamente da indústria de Celulose Cenibra, a qual pode estar relacionada à maior proliferação de algas decorrentes dos efluentes industriais (local à montante, mais próximo de Naque).

Com relação à temperatura, observa-se que este parâmetro tende a aumentar ao longo do percurso do Rio, à medida que a altitude tende a diminuir e a latitude a diminuir. Ao comparar as seis estações de monitoramento verifica-se que a região do Rio do Carmo (mais próximo ao Rio Gualaxo do Norte) apresenta menor temperatura da água média em relação aos demais locais. De forma geral, os valores de precipitação foram maiores no verão (época chuvosa) quando comparados ao inverno (época seca), para a maioria dos pontos, com exceção do ponto RDO 16, que corresponde à Foz do Rio Doce, em Regência. Porém, vale ressaltar que o mês de Janeiro de 2019 apresentou uma baixa pluviosidade quando comparada a outros anos, levando à redução destes valores e refletindo na biodisponibilidade dos contaminantes.

Para a turbidez é possível observar significativa diferença entre os níveis apresentados no verão e inverno, sendo maior na época chuvosa (verão), onde há maior vazão e consequentemente a resuspensão do sedimento. Apesar do alto desvio padrão dos dados do verão, observou-se que para alguns pontos e medições pontuais os valores de turbidez ultrapassaram os níveis estipulados pelo CONAMA. De fato, dentre os parâmetros avaliados pela Renova (2019), a turbidez é o que representa maior desconformidade com relação à Resolução Conama no 357, sendo evidenciada pela alta concentração de sólidos suspensos. O relatório anual de 2019 mostra que após o rompimento da barragem em 2015 houve significativo aumento da turbidez, quando comparados aos dados de pré-rompimento, e que este parâmetro se mantém fora dos níveis recomendados pela legislação mesmo 3 anos após o desastre ambiental.

Este parâmetro apresenta uma importante relação com a biodisponibilidade dos contaminantes, uma vez que muitos se aderem às partículas em suspensão, o que implica em uma maior toxicidade potencial à medida que a turbidez aumenta. É importante destacar que a maioria dos estudos quantificam as substâncias químicas presentes na água (filtradas) e sedimento, não considerando a sua presença no material em suspensão, podendo acarretar na subestimação dos seus níveis reais no ambiente.

TABELA 4 – Parâmetros físico-químicos da água de seis estações de monitoramento da Renova, localizadas na bacia do Rio Doce, durante o verão e inverno de 2019.

Summer 2019	Chlorophyll a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cyanob. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conductiv. ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Turbidity (UNT)	Dis. (mg.L^{-1})	O ₂	pH	Precip. (mm)
CONAMA 357*	< 30 $\mu\text{g/L}$				>100	>5 mg/L		6 a 9	
		0.19		27.89	61.19	7.49	7.53	$\pm 0.1^a$	19.33
RCA 02	1.33 $\pm 0.2^a$	$\pm 0.1^a$	63.51 $\pm 5,1$	$\pm 0.9^a$	± 63.2	$\pm 0.1^a$	$\pm 0.1^a$	$\pm 0.1^a$	± 28.9
		0.21		28.88	43.76	8.24	7.60	$\pm 0.2^b$	18.07
RDO 01	1.39 $\pm 0.1^a$	$\pm 0.0^a$	60.20 $\pm 4,9$	$\pm 16^b$	± 42.6	$\pm 0.4^b$	$\pm 0.2^b$	$\pm 0.2^b$	± 18.7
		0.70		29.99	78.9	8.04	7.20	$\pm 0.1^c$	15.03
RDO 05	3.99 $\pm 1.9^b$	$\pm 0.6^b$	90.30 $\pm 12,4$	$\pm 0.9^b$	± 51.9	$\pm 0.2^{ab}$	$\pm 0.1^c$	$\pm 0.1^c$	± 19.5
		0.21		30.97	46.70	6.64	7.36	$\pm 0.2^c$	24.13
RDO 08	1.36 $\pm 0.3^a$	$\pm 0.0^a$	73.93 $\pm 8,0$	$\pm 1.2^b$	± 35.2	$\pm 0.4^c$	± 0.2	± 0.2	± 45.7
		0.10		31.16	55.37	6.79	7.30	$\pm 0.2^a$	16.67
RDO 12	1.41 $\pm 0.3^a$	$\pm 0.0^a$	67.26 $\pm 5,4$	$\pm 0.7^b$	± 39.8	$\pm 0.1^c$	$\pm 0.1^c$	$\pm 0.1^c$	± 22.0
		0.19		30.46	53.36	6.70	7.24	$\pm 0.1^a$	13.29
RDO 16	1.93 $\pm 0.6^a$	$\pm 0.1^a$	155.56 ± 174	$\pm 0.5^b$	± 58.1	$\pm 0.5^c$	$\pm 0.5^c$	$\pm 0.5^c$	± 17.0

Winter 2019	Chlorophyll a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Cyanob. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conductiv. ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Turbidity (UNT)	Dis. (mg.L^{-1})	O ₂	pH	Precip. (mm)
CONAMA 357*	< 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$				>100	>5 mg.L^{-1}		6 a 9	
RCA 02		0.10		19.73		8.70	7.33	8.97	
	0.40 $\pm$ 0.2 ^a	$\pm$ 0.1	73.53 $\pm$ 19.8 ^a	$\pm$ 1.3 ^a	6.23 $\pm$ 1.8 ^a	$\pm$ 0.1 ^a	$\pm$ 0.1	$\pm$ 6.7 ^a	
RDO 01		0.07		20.97			7.67	12.37	
	0.50 $\pm$ 0.1 ^a	$\pm$ 0.1	55.70 $\pm$ 3.5 ^a	$\pm$ 1.4	6.67 $\pm$ 1.9 ^a	8.33 $\pm$ 0.2	$\pm$ 0.1	$\pm$ 9.3 ^a	
RDO 05		0.10	120.00	22.67	15.63		7.17	2.03	
	0.77 $\pm$ 0.1 ^a	$\pm$ 0.0	$\pm$ 11.0 ^a	$\pm$ 1.5	$\pm$ 4.4 ^b	8.43 $\pm$ 0.1	$\pm$ 0.1	$\pm$ 2.6 ^a	
RDO 08		0.13		24.47		7.97	7.40	3.80	
	0.77 $\pm$ 0.1 ^a	$\pm$ 0.1	99.10 $\pm$ 6.8 ^a	$\pm$ 1.6 ^b	3.67 $\pm$ 2.6 ^a	$\pm$ 0.3 ^b	$\pm$ 0.1	$\pm$ 4.7 ^a	
RDO 12		0.27		23.93			7.33	6.83	
	1.87 $\pm$ 0.5 ^b	$\pm$ 0.3	86.50 $\pm$ 3.9 ^a	$\pm$ 1.5	3.17 $\pm$ 0.5 ^a	8.17 $\pm$ 0.1	$\pm$ 0.1	$\pm$ 3.3 ^a	
		0.00	1154.20	24.23		7.77	7.47	62.33	
RDO 16	1.00 $\pm$ 0.1 ^a	$\pm$ 0.0	$\pm$ 927.7 ^b	$\pm$ 1.9 ^b	8.85 $\pm$ 0.8	$\pm$ 0.2 ^b	$\pm$ 0.4	$\pm$ 23.1 ^b	

RCA 02 – Rio do Carmo 02 (Barra Longa, Mg, local mais próximo do Rio Gualaxo do Norte); RDO 01 – Rio Doce 01 (Rio Doce, Mg, montante barragem de Candonga); RDO 05 – Rio Doce (Belo Oriente, Mg, local próximo de Naque); RDO 08 – Rio Doce 08 (Governador Valadares, MG); RDO 12 – Rio Doce 12 (Colatina, ES); RDO 16 – Rio Doce (Regência, ES, foz do Rio Doce). Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

Sedimento

Granulometria

A granulometria representa um dos parâmetros mais fundamentais para a caracterização dos sedimentos, podendo fornecer evidências sobre a hidrodinâmica do sistema, as condições de sedimentação, a distribuição e a capacidade adsorptiva de elementos químicos neste compartimento ambiental. Quanto menor a granulometria, maior a sua relação área-superfície, e consequentemente a capacidade de troca catiônica aumenta, assim como a sua capacidade adsorptiva por metais (Cruz et al, 2013).

As características fisiográficas diferenciadas dos trechos do Rio Doce são evidenciadas pelos resultados obtidos na análise granulométrica do sedimento (TABELA 5). Nas amostras de sedimentos coletados em GUA, GOV e no baixo Rio Doce (AIM, COL e LIN), a fração arenosa foi predominante, apresentando grânulos maiores que 150 μm para mais de 50% da sua composição. GOV foi o local de amostragem que apresentou maior composição de areia muito grossa (26,6%), enquanto REF foi o que demonstrou maior proporção de silte e argila (<65%). Em seguida, NAQ e CAN foram as amostras que apresentaram maior composição de silte e argila (41% e 24%, respectivamente), sendo que CAN foi o local que também apresentou maior proporção de areia muito fina

(54% com > 63 mm). Esta textura mais fina nos sedimentos de CAN já era esperada pois além de representar um reservatório da UHE de Risoleta Neves, é o local onde ficou retida boa parte do rejeito de minérios de Fe da barragem do Fundão. É possível que estes locais onde foram encontradas maior composição de partículas finas, como em NAQ e CAN, tenha ocorrido maior retenção da onda inicial da lama de rejeito nestas regiões.

No trecho do Baixo Rio Doce, a declividade pouco acentuada favorece o processo de sedimentação, com áreas constituídas por sedimento arenoso, além da formação de um amplo sistema de várzeas próximo à foz. De acordo com Hatje et al. (2017), após a passagem da onda do rejeito de ferro houve uma transformação ativa do sistema fluvial ao longo do Rio Doce, sendo o sedimento classificado em arenoso-siltoso, e em eventos de cheia as partículas finas são ressuspensas e transportadas a jusante, elevando significativamente a concentração de sólidos suspensos na água.

É importante ressaltar que adicionalmente ao impacto da mineração, outras atividades antrópicas presentes ao longo do rio, como a agricultura e a construção de usinas hidrelétricas também são responsáveis por afetar a geomorfologia do Rio Doce, intensificando os processos de assoreamento e desvio dos percursos naturais do rio.

TABELA 5. Composição granulométrica das amostras de sedimento coletadas nos 8 pontos da bacia do Rio Doce no verão de 2019.

Classif.		Biogenics	Gravel	Very coarse sand	Coarse sand	Medium sand	Fine sand	Fine sand	Very Fine sand	Silty Clay
Site	Initial weight (g)		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
			>1mm	1mm	500µm	250µm	150µm	125µm	63µm	< 63µm
GUA	120	Leaves	0.42	5.39	8.98	22.47	38.59	6.41	10.91	6.84
CAN	111,81	-	9.66	0.04	0.06	0.21	13.39	5.76	48.57	22.31
NAQ	117,87	-	1.50	8.41	23.59	20.96	5.93	0.38	3.81	35.42
REF	100,92	Leaves	2.15	24.09	9.19	6.76	22.72	3.64	19.17	12.28
GOV	110,43	and shells								
		Leaves	4.27	2.43	5.97	4.28	7.59	1.17	9.45	64.84
AIM	103,14	and shells								
		Leaves	2.01	2.47	14.61	25.48	24.48	2.07	8.32	20.55
COL	103,63	Leaves	1.17	11.67	26.12	21.52	22.38	2.07	9.45	5.64
LIN	120	-	1.68	14.95	18.93	20.62	22.59	2.50	9.92	8.81

Matéria Orgânica

Da mesma forma que a granulometria, a concentração da matéria orgânica do sedimento é outro parâmetro importante para indicar o potencial de adsorção e distribuição dos contaminantes químicos neste compartimento ambiental. Partículas finas que apresentam maior teor de carbono orgânico tendem à uma maior adsorção de compostos orgânicos hidrofóbicos e de metais.

A concentração de matéria orgânica variou entre os oito locais de coleta, sendo maior no ponto referência (Rio Corrente) e menor no Alto Rio Doce, principalmente no Rio Gualaxo do Norte (TABELA 6). O ponto Referência foi o que apresentou maior percentagem de partículas finas (silte e argila), além da maior concentração da matéria orgânica. Esta relação pode ser comumente encontrada em outros ambientes aquáticos devido ao acúmulo de detritos advindos da decomposição e não necessariamente reflete um quadro de poluição. Apesar do Rio Corrente Grande diferir em alguns de seus parâmetros físico-químicos quando comparado às demais localidades do Rio Doce, somente as análises químicas de metais e poluentes orgânicos poderão confirmar o quadro de contaminação deste ambiente. Por outro lado, provavelmente os maiores níveis de matéria orgânica em Governador Valadares estejam associados ao lançamento de efluentes sem tratamento adequado. Já no baixo Rio Doce, os níveis podem estar relacionados à atividade de agricultura, a qual utiliza fertilizantes, além do despejo de efluentes domésticos e industriais das cidades na região.

TABELA 6. Teor da matéria orgânica (OM) das amostras de sedimento do Rio Doce coletadas no verão e inverno de 2019.

	OM (%) Summer	OM (%) Winter
GUA	5.24 ^a	5.25 ^a
CAN	5.21 ^a	5.35 ^b
NAQ	5.26 ^a	5.36 ^b
REF	6.25 ^b	6.25 ^c
GOV	5.46 ^c	5.81 ^d
AIM	5.60 ^b	5.42 ^b
COL	5.48 ^{bc}	5.50 ^b
LIN	5.37 ^c	5.24 ^a

Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b).

Análises químicas

Metais

As análises químicas dos metais na água e no sedimento estão em andamento e devem ser concluídas até o final de 2020. Parte das amostras do sedimento, já extraídas, foram analisadas através do Espectrofotômetro de Absorção Atômica (FAAS, Varian, AA 240FS) do Instituto de Oceanografia da USP, porém aguardam confirmação dos dados. As amostras de água filtradas e acidificadas aguardam a análise de detecção. Por fim, as amostras dos tecidos dos peixes (brânquias e músculos) aguardam o processo de extração e detecção que devem ser finalizados até 2021.

Desde o rompimento da barragem do Fundão, em Novembro de 2015, muitos são os estudos reportando os altos níveis de metais encontrados ao longo da Bacia do Rio Doce. Logo após o acidente, foram registradas elevadas concentrações de Fe ($1166 \mu\text{g.L}^{-1}$) e Mn ($728 \mu\text{g.L}^{-1}$) na água, ultrapassando os limites legais permissíveis (Conama nº 357/2005), principalmente nos pontos mais próximos da barragem, entre o Rio Gualaxo do Norte e o reservatório de Candonga. Outros elementos detectados foram: Al, As, Pb, Cr, Cu e Ni, porém a maioria em níveis dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, com exceção dos valores máximos detectados pelo IGAM e reportados pela ANA (2015).

No sedimento, observou-se novamente as altas concentrações de Fe ($>15\%$) e Mn (até $2916 \mu\text{g.g}^{-1}$) logo após o rompimento da barragem em 2015, porém seus níveis altos se mantiveram ao longo de todo o Rio Doce, até próximo de sua foz em Linhares (TABELA 8). No Brasil, inexistem quaisquer padrões legais para as concentrações de Fe e Mn em sedimentos de corpos de água doce, dificultando uma avaliação mais precisa dos seus potenciais riscos no ambiente, havendo uma maior urgência na determinação dos níveis seguros de exposição. Neste caso faz-se necessária uma comparação dos dados com os padrões internacionais disponíveis (CCME, 1999; US EPA, 1987) ou com os valores backgrounds para a região obtidos em estudos prévios (Nascimento et al., 2018; Leão et al., 2019). Já os metais não essenciais de maior potencial tóxico como Cd (acima de $4 \mu\text{g.g}^{-1}$ em diversos pontos) e Cr ($103 \mu\text{g.g}^{-1}$ em Governador Valadares) e o metaloide As, apresentaram concentrações acima das permissíveis, enquanto Pb, Hg e Ni encontraram-se dentro dos limites legais.

Com os processos naturais de sedimentação e depuração da água, as concentrações destes metais na água decaíram significativamente em menos de 6 meses após o acidente (GIAIA, 2016), ainda que tal coleta tenha sido realizada durante a estiagem, quando o rio apresenta menor vazão, sendo esperada menor quantidade de material em suspensão. Porém seus níveis ainda se mantiveram relativamente altos e os efeitos na biota ainda permanecem inconclusivos. É importante ressaltar que os efeitos destes metais nos organismos, mesmo em concentrações baixas, principalmente os elementos traço As, Cd e Pb, podem ser potencializados através de interações sinérgicas ou aditivas (Norberg et al., 2015), uma vez que estão presentes em misturas complexas neste ambiente. De acordo com o relatório mais recente da Renova (2019), mesmo decorridos 3 anos do acidente, as concentrações de manganês na água ainda se mantêm acima dos limites legais estabelecidos pela legislação brasileira, inclusive quando comparadas aos níveis quantificados antes do rompimento da barragem. Observa-se ainda um padrão de gradiente de contaminação, com uma diminuição dos seus níveis ao longo do percurso do Rio, ou seja, maiores concentrações no Alto Rio Doce, local mais próximo das atividades de mineração. Outros metais que também se encontram em desconformidade são o ferro e o chumbo, principalmente nos locais mais próximos da origem do Rio Doce. Portanto, de acordo com os dados da Renova verifica-se uma tendência na melhora da qualidade da água do Rio Doce, de montante à jusante, para os parâmetros avaliados dos metais. Com relação ao rejeito do minério de ferro, foi possível observar visivelmente a sua deposição ao longo de toda a extensão do Rio Doce, durante as coletas em campo realizadas no presente estudo. Análises da composição química da lama em 2015, indicaram a predominância dos analitos SiO₂ (47,3%), Fe (18,6%), Mn (6,6%), Cu e Cr, e um reduzido tamanho de suas partículas (1 a 200µm), apresentando um considerável risco de exposição humana por vias aéreas, em caso de ressuspensão na atmosfera (Segura et al., 2016). Os autores deste mesmo estudo ainda demonstraram que através da extração com agentes complexantes (CaCl₂, CH₃COOH e EDTA), foi possível verificar a mobilização de diferentes elementos, inclusive os de maior potencial tóxico como Pb, Cd e Cr. Portanto alterações nas condições físico-químicas no ambiente, como aumento do pH, potencial de óxido-redução e composição química da água, podem afetar diretamente na disponibilidade destes metais para os organismos.

Por fim, estudos prévios ao acidente, assim como estudos recentes que comparam amostras coletadas antes da passagem da lama, ou em locais onde não houve a sua

passagem, evidenciam o quadro de contaminação crônica pré-existente da Bacia do Rio Doce (Hatje et al., 2017). A introdução do Hg, através da extração do ouro durante décadas e o garimpo ilegal ainda existente na região são um dos fatores responsáveis pelos impactos negativos na bacia (da Penha Rhodes et al., 2018). Adicionalmente à ampla atividade de mineração exercida na região do Alto Rio Doce, outras atividades como a indústria, a urbanização e a agricultura são outras fontes poluidoras que introduzem metais no ambiente. O cenário de contaminação ainda se agrava, pois estas fontes ainda são responsáveis por liberar compostos orgânicos que podem apresentar diferentes potenciais tóxicos aos organismos e à própria população humana que depende do abastecimento público da água proveniente da Bacia do Rio Doce.

Compostos orgânicos

Assim como as amostras de sedimento para análise dos metais, já foi feita a extração dos compostos orgânicos tanto do sedimento como da água, porém, aguardam a detecção destes compostos em GC-MS/MS e HPLC-DAD. Parte das amostras da água já foram injetadas no equipamento, porém no final de 2019 as análises foram interrompidas devido à um problema no funcionamento do equipamento, o qual aguarda o conserto. Prevê-se que estas análises sejam concluídas até o final de 2020.

Ao contrário dos contaminantes inorgânicos, não foi encontrado nenhum estudo na literatura que reporte a detecção de poluentes orgânicos ao longo da Bacia do Rio Doce, após o acidente em 2015. Apenas um estudo de 2008 demonstrou a ocorrência de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na região do Médio Rio Doce, na cidade de Ipatinga, onde há intensa atividade industrial siderúrgica (Lima, 2008). De acordo com o estudo, HPAs de maiores massas molares (4 a 6 anéis) e de potencial tóxico, como o benzo[a]pireno, foram detectados na água em concentrações (99 ng/L) acima dos limites estabelecidos pela legislação. Sabe-se que a partir do trecho do Médio Rio Doce, existem diversas atividades humanas, como as indústrias, efluentes domésticos e a agricultura que potencialmente introduzem contaminantes neste ecossistema, durante décadas. A ocorrência destes poluentes tem sido negligenciada por muitos estudos, representando até hoje uma lacuna nos diagnósticos da qualidade da água do Rio Doce, e constituindo um obstáculo para a interpretação de dados ecotoxicológicos e ecológicos. Portanto, o presente estudo, visa esclarecer este gap, integrando os dados tanto dos

contaminantes inorgânicos, como dos orgânicos e seus potenciais efeitos causados na biota para uma melhor compreensão dos reais riscos ambientais e humanos.

Coleta dos peixes no Rio Doce e distribuição de espécies

No total foram coletados 620 peixes na bacia do Rio Doce durante o verão e inverno de 2019. A espécie mais abundante e consequentemente a mais coletada ao longo da bacia do Rio Doce foi o lambari (*Astyanax lacustris*, Characidae), com 109 exemplares no verão e 167 no inverno (TABELA 7). Em todos os 8 locais de amostragem foi possível obter uma média de 13 indivíduos no verão e 20 no inverno, sendo o mínimo de 2 indivíduos coletados em Colatina (local de menor ocorrência do lambari) e no máximo de 30 indivíduos, com maior facilidade de captura em Candonga, Naque, Governador Valadares, Aimorés e Linhares. Em seguida, o grupo mais capturado foram os Siluriformes (“bagres”), com 108 indivíduos capturados no verão (média de 13 por local) e 97 no inverno (média de 12 por local). Entre os bagres, a espécie mais frequente ao longo do rio foi o mandi (*Pimelodus maculatus*), sendo encontrada apenas a partir do médio Rio Doce (Naque, Rio Corrente, Governador Valadares, Aimorés, Colatina e Linhares). Já no alto Rio Doce as espécies de bagres que predominaram foram o jundiá (*Rhamdia quelen*), única encontrada no Rio Gualaxo do Norte, e a cumbaca (*Trachelyopterus striatulus*), coletada em Candonga e Aimorés. Outro grupo de Siluriformes comumente encontrados foram os cascudos, tendo sido capturados 52 exemplares no verão (média de 7 indivíduos por local) e 47 no inverno (média de 6 indivíduos por local), sendo a espécie mais abundante o cascudo viola (*Loricariichthys castaneus*) seguido do cascudo do gênero *Hypostomus* sp. Este grupo foi capturado em todos os locais ao longo do Rio Doce, exceto no Rio Gualaxo do Norte. Por fim, também foram capturadas outras espécies de peixes como o cará ou papa-terra (*Geophagus brasiliensis*) e a traíra (*Hoplias* sp.), com um total de 34 e 6 indivíduos respectivamente. Devido ao baixo n amostral obtido para estas espécies, estas não foram considerados neste estudo.

TABELA 7 – Dados dos peixes coletados nos oito pontos da Bacia do Rio Doce durante o verão e inverno de 2019.

Lambaris	Summer			Winter		
	<i>N (sex)</i> Lambaris	<i>Weight (g)</i> Lambaris	<i>Length (cm)</i> Lambaris	<i>N (sex)</i> Lambaris	<i>Weight (g)</i> Lambaris	<i>Length (cm)</i> Lambaris
GUA	11 (6M/5F)	16.9 (±8.2) ^{ab}	10.3 (±1.2)	5 (2M/3F)	16.1 (±4.0)	10.0 (0.6±)
CAN	19 (3M/13F/3NI)	15.1 (±3.6) ^b	9.8 (±1.3)	30 (8M/9F/13NI)	14.6 (±9.5) ^a	9.5 (±2.0)
NAQ	14 (7M/5F/2NI)	10.6 (±5.9) ^b	8.4 (±1.0)	30 (8M/5F/17NI)	17.0 (±3.6)	10.5 (±0.6)
REF	8 (5M/1F)	27.3 (±12.1) ^a	10.7 (±2.4)	10 (7F/3NI)	30.3 (±6.9) ^b	13.4 (±2.0)
GOV	15 (12M/3F)	17.6 (±6.2) ^{ab}	10.3 (±0.9)	30 (6M/9F/15NI)	27.19 (±11.0) ^b	11.4 (±1.2)
AIM	14 (8M/3F/3NI)	16.4 (±6.9) ^{ab}	10.2 (±0.9)	30 (7M/8F/15NI)	13.2 (±2.1) ^a	9.9(±0.5)
COL	5 (1M/4NI)	6.8 (±2.0) ^c	8.7 (±1.0)	2 (NI)	13.6 (±0.14) ^a	10.0 (±0.1)
LIN	23 (NI)	6.8 (±2.2) ^c	7.3	30(4M/11F/15NI)	12.7 (±2.6) ^a	9.8 (±0.5)
TOTAL	109			167		
Catfish	<i>N (sex)</i> Catfish	<i>Weight (g)</i> Catfish	<i>Length (cm)</i> Catfish	<i>N (sex)</i> Catfish	<i>Weight (g)</i> Catfish	<i>Length (cm)</i> Catfish
	Catfish	Catfish	Catfish	Catfish	Catfish	Catfish
GUA	14 (9F/ 5M)	73.4 (±27.7) ^a	21.5 (±2.4)	10 (4M/6F)	146.4 (±80.7)	25.5 (±6.2)
CAN	9 (3M/2F/4NI)	56.1 (±100.5) ^b	15.0 (±7.2)	4 (2M/2NI)	117.0 (±66.9)	17.2 (±3.4)
NAQ	10 (3M/5F/2NI)	94.5 (±46.8) ^a	21.5 (±4.7)	12 (6M/ 5F/ 1NI)	105.1 (±30.0) ^a	23.2(±1.9)
REF	3 (1M/ 2NI)	109.5 (±67.1)	20.7 (±5.3)	14 (2M/11F/1NI)	155.7 (±49.5)	26.1(±2.2)
GOV	13 (5 F/3M/5NI)	168.2 (±52.6) ^a	25.0 (±2.5)	10 (2M/2F)	358.0 (±93.0) ^b	32.6 (±2.5)
AIM	19 (8M/ 11NI)	57.3 (±26.4)	16.36 (±1.9)	10 (3M/5F2/2NI)	124.7 (±77.8) ^a	22.6 (±4.4)
COL	19 (5M/8F/6NI)	82.9 (±54.1) ^a	21.4 (±3.7)	20 (9M/10F/1NI)	86.8 (±48.1) ^a	22.3 (±3.4)
LIN	14 (3M/6F/5NI)	138.6 (±73.3) ^a	25.8 (±4.9)	17 (6M/11F)	158.9 (±68.3)	25.6 (±3.7)
TOTAL	101			97		

GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. F – Fêmea. M – Macho. NI – sexo não identificado. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b).

A distribuição não uniforme das espécies capturadas já era esperada para um rio de grande porte como o Rio Doce, o qual apresenta distintas características limnológicas e atividades humanas ao longo do seu percurso (Instituto Estadual de Florestas MG, 2009). O conhecimento da biodiversidade ictiofaunística representa um importante parâmetro para a avaliação dos impactos ambientais decorrentes das atividades antrópicas. De acordo com Vieira (2009), antes do rompimento da barragem do Fundão, eram registradas aproximadamente 71 espécies de peixes nativas (15% em extinção) e 28 exóticas da bacia do Rio Doce. Após o desastre ambiental houve uma elevada mortalidade de peixes e seus efeitos na ictiofauna ainda são indeterminados. Sabe-se que a elevada turbidez da água somada aos baixos níveis de oxigênio dissolvido na água após a passagem da onda de lama, são prováveis fatores responsáveis pela alta mortalidade, além dos altos níveis de metais ressuspensos na água (ANA, 2015). O primeiro levantamento da ictiofauna após o acidente, publicado pelo GIAIA (Dergam et al., 2017) identificou a ocorrência de 39 espécies na bacia do Rio Doce, entre nativas e exóticas (33%

Characiformes, 41% Siluriformes e 15% Perciformes) e sugere um aumento da riqueza das espécies de peixes em direção à foz do Rio Doce, e a presença de espécies mais “resistentes no alto Rio Doce, como o lambari e o jundiá.

Tanto o lambari (*Astyanax lacustris*) como o jundiá e os cascudos capturados neste estudo são descritos como espécies nativas do Rio Doce ocorrendo nas três regiões da bacia (Alto, médio e baixo), enquanto o mandi ocorre apenas no médio e baixo Rio Doce e é considerada como uma espécie exótica, por ter sido introduzida no rio (Vieira et al., 2015). Além da distância física entre os locais de coleta, as distintas características limnológicas entre os pontos impossibilitaram a obtenção das mesmas espécies com um n amostral desejado ao longo do Rio Doce, mesmo havendo um esforço amostral significativo e semelhante nos locais de coleta. Apesar da importância da comparação das respostas entre indivíduos de uma mesma espécie para uma avaliação ecotoxicológica mais adequada, este estudo propõe uma comparação entre espécies de peixes pertencentes a um mesmo nicho trófico para possibilitar uma avaliação mais integrada a fim de responder a relação entre: a presença de poluentes no Rio Doce x potencial bioacumulação e suas consequentes respostas nestes organismos. Além disso, com exceção dos dados obtidos para a espécie *Astyanax fasciatus*, uma análise comparativa considerando uma mesma espécie de bagre ou cascudo não garantiria um n amostral adequado para todos os pontos. De acordo com Tincani et al. (2019), espécies diferentes de um mesmo gênero (ex. o gênero *Astyanax sp.*) podem apresentar respostas ecotoxicológicas semelhantes, como os danos em macromoléculas, permitindo uma análise comparativa entre espécies diferentes quando estas apresentam, além de uma relação filogenética, características ecológicas, morfológicas e comportamentais similares. Assim, é possível que espécies de bagres como o mandi (*P. maculatus*) e jundiá (*R. quelen*) apresentem respostas ecotoxicológicas semelhantes, uma vez que ambos ficam em contato com o sedimento e apresentam hábito alimentar onívoro.

Por outro lado, para um diagnóstico ambiental mais adequado, é importante também considerar a avaliação da resposta de diferentes espécies de peixes preferencialmente pertencentes a nichos tróficos distintos, como é o caso dos bagres e lambaris neste estudo. Não só por apresentarem metabolismos diferentes de acordo com a espécie, seus hábitos alimentares influenciam diretamente na exposição e bioacumulação dos contaminantes, sendo importante considerar estes fatores. O lambari

por ser um peixe que nada livre na coluna d'água e pelo seu hábito alimentar preferencialmente herbívoro apresenta diferentes formas de exposição aos contaminantes quando comparados aos bagres que ficam em contato com o sedimento e são onívoros.

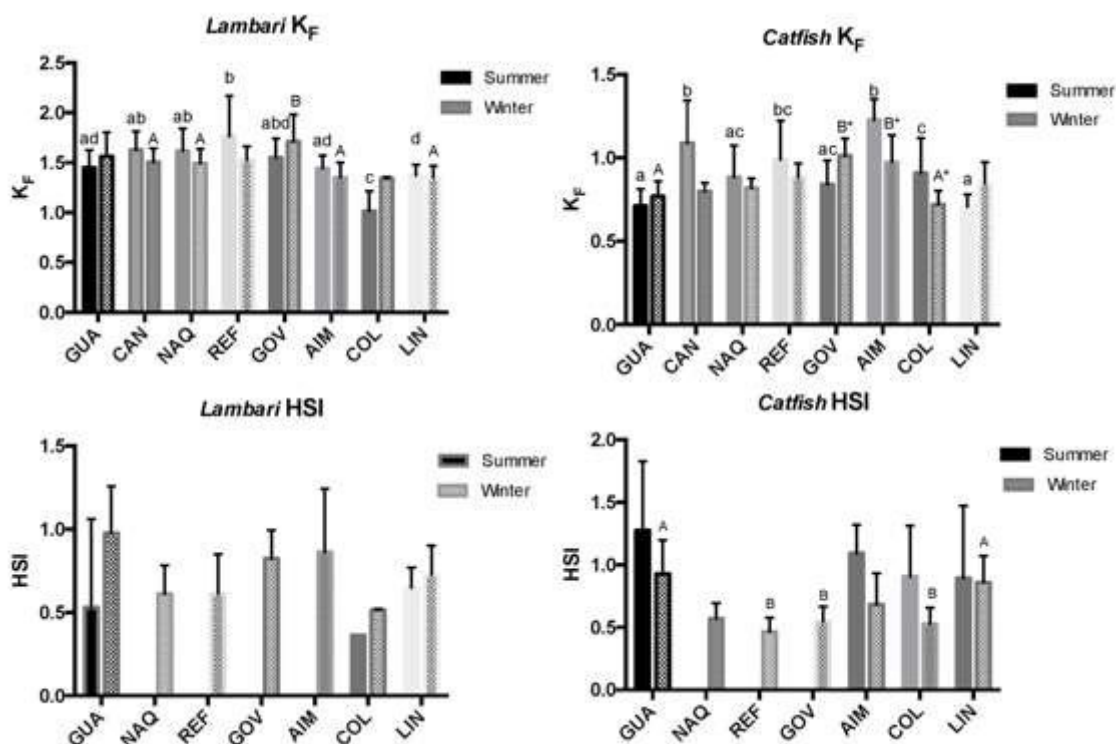
Ainda considerando a mesma espécie entre os pontos, observou-se diferenças no peso dos peixes capturados tanto no verão como no inverno. De modo geral, os lambaris do ponto referência foram os que apresentaram maior tamanho, e os de Colatina e Linhares, os de menor tamanho, tanto para o verão como para o inverno. Os lambaris de GOV do inverno também apresentaram maior tamanho quando comparados aos peixes do baixo Rio Doce (AIM, COL e LIN). De forma semelhante, os bagres (mandis) de Governador Valadares também apresentaram maior peso, tanto para a coleta do verão como para a do inverno, enquanto os peixes de Candonga (cumbaca) apresentaram menor porte. Apesar destas diferenças possivelmente influenciarem em algumas respostas analisadas nos peixes, as análises estatísticas de correlação e integração dos dados podem auxiliar na compreensão da interferência destes fatores nas diferentes respostas dos peixes.

Índices somáticos

Com relação ao fator de condição, observou-se que os lambaris de REF (verão) apresentaram os maiores valores, principalmente quando comparados aos peixes de COL e LIN (FIGURA 17). No inverno os lambaris de GOV apresentaram os maiores valores de Kf, estatisticamente diferentes de CAN, NAQ, AIM e LIN. Já os bagres de CAN, REF e AIM (verão) apresentaram maiores valores que os peixes de GUA e LIN, enquanto no inverno foram os bagres de GOV e AIM que apresentaram os maiores Kf.

Para o índice hepatossomático (HSI), não foi possível observar diferença significativa entre os tamanhos relativos dos fígados dos lambaris. Para os bagres verificou-se que os jundiás de GUA (inverno) apresentaram maiores valores de HSI, quando comparados aos mandis de REF, GOV e COL. Apesar da comparação entre espécies diferentes de bagres, é possível que o tamanho relativo maior do fígado dos jundiás de GUA esteja relacionado à exposição dos contaminantes presentes na região. Uma confirmação deste resultado pode ser obtida pela comparação com outras análises como a histopatologia do fígado, a qual poderia demonstrar alterações significativas decorrentes da poluição e não devido à anatomia específica de cada espécie.

FIGURA 17. Fator de condição (K_F) e índice hepatossomático (HSI) dos peixes do Rio Doce do verão e inverno de 2019.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

Biomarcadores

Análises Bioquímicas

Glutathione-S-transferase (GST) e Glutathione reduzida (GSH) no fígado

A atividade da GST foi maior nos lambaris do inverno de NAQ e menor em GUA, AIM e LIN, enquanto nos bagres a atividade foi maior em AIM (verão) e CAN (inverno), quando comparados à GUA, NAQ, COL e LIN para ambas as estações (Figura 18). É possível que a menor atividade da GST observada nos peixes de GUA esteja relacionada tanto à uma menor ocorrência de poluentes orgânicos nesta região, assim como à capacidade de inibição da sua atividade ou depleção da GSH por alguns metais. A Glutathione-S-transferase, como sugere seu próprio nome, é uma enzima de biotransformação de fase II, pois catalisa reações de transferência, conjugando uma glutathione reduzida a um xenobiótico orgânico eletrofílico para facilitar a sua excreção

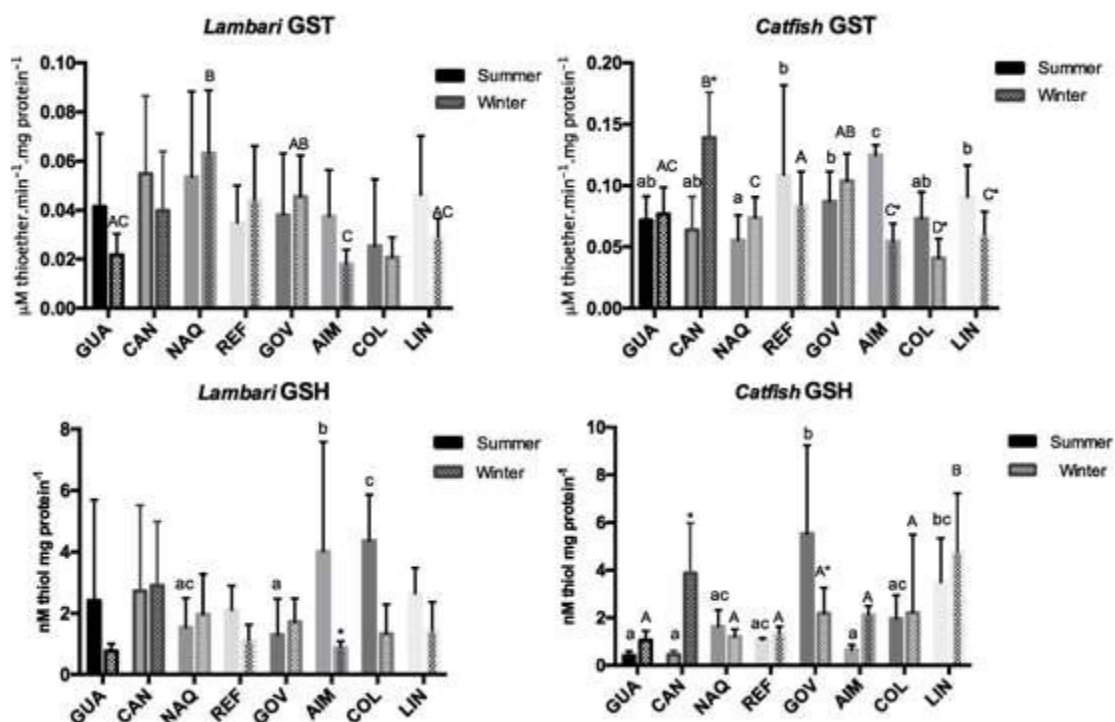
(Boelsterli, 2007). Assim, na presença de poluentes orgânicos sua expressão e atividade podem ser aumentadas, enquanto alguns metais podem diminuir a sua capacidade antioxidante contribuindo para o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Özaslan et al., 2017).

Para a análise de tióis não-protéicos, como a GSH observaram-se maiores níveis no fígado de lambaris de AIM e COL (verão) e bagres de GOV (verão) e LIN (verão e inverno) e menores níveis em bagres de GUA, NAQ, REF e AIM (Figura 18). Estes níveis de GSH foram correlacionados significativamente com a atividade da GST apenas nos lambaris do inverno ($R = 0,48$, $p < 0,001$), o que sugere que para a maioria dos outros organismos a GSH possa estar atuando através de outras vias independentes da GST. Tanto a GST como a GSH atuam no equilíbrio redox celular, participando do sistema de defesa antioxidante para combater os efeitos nocivos das EROs. A glutathiona reduzida (GSH), além de ser co-fator da GST e da glutathiona peroxidase (GPx), é um tripetídeo com grande potencial redutor devido ao seu grupo -SH do resíduo da cisteína, apresentando um papel importante protetor como *scavenger* de radicais e como o antioxidante solúvel mais abundante no citosol, núcleo e mitocôndrias (Jones, 2006; Valko et al., 2007). Metais redox-inativos como o chumbo e cádmio, podem diminuir os níveis de GSH (Ercal et al., 2001), o que poderia explicar novamente as menores concentrações de tióis não-proteicos detectados nos peixes de GUA, do Alto Rio Doce.

Alguns metais de transição redox-ativos, como $\text{Fe}^{2+/3+}$ e Cu^{2+} são catalizadores do quadro de estresse oxidativo devido à sua participação nas reações de Fenton, onde o peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila, o qual apresenta alta reatividade (Jomova & Valko, 2011). Outro elemento essencial que também pode ser prejudicial tanto na deficiência nutricional como na exposição excessiva é o manganês. Em níveis normais, além de estar envolvido na síntese e ativação de muitas enzimas, como a Superóxido dismutase (MnSOD) para combater radicais superóxido, o Mn também contribui para o metabolismo energético de carboidratos e lipídios (Aguirre & Culotta, 2012). Porém, seus mecanismos de desregulação do “status” redox celular normal são distintos do Fe e Cu. Quando há uma sobrecarga dos níveis de Mn pode haver uma disfunção mitocondrial pela alteração da permeabilidade da membrana, inibição da produção de ATP e aumento da produção de EROs, podendo resultar em doenças metabólicas e neurológicas (Kaur et al., 2017; Li & Yang, 2018). A exposição simultânea excessiva ao Fe e ao Mn pode ser um

problema ainda maior, uma vez que o Mn reduz o transporte de Fe e inibe a formação do grupo heme, da mesma forma como o chumbo(ATSDR, 2007), interferindo na homeostase e metabolismo do Fe (Kaur et al., 2017). Portanto, se os efeitos nocivos das EROs não são compensados pelo sistema de defesa antioxidante, os pró-oxidantes podem causar diversos danos celulares, desestruturando macromoléculas como os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e consequentemente na etiologia de doenças.

FIGURA 18. Atividade da GST e níveis de GSH em lambaris e bagres coletados no verão e inverno de 2019, nos oito pontos da bacia do Rio Doce.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

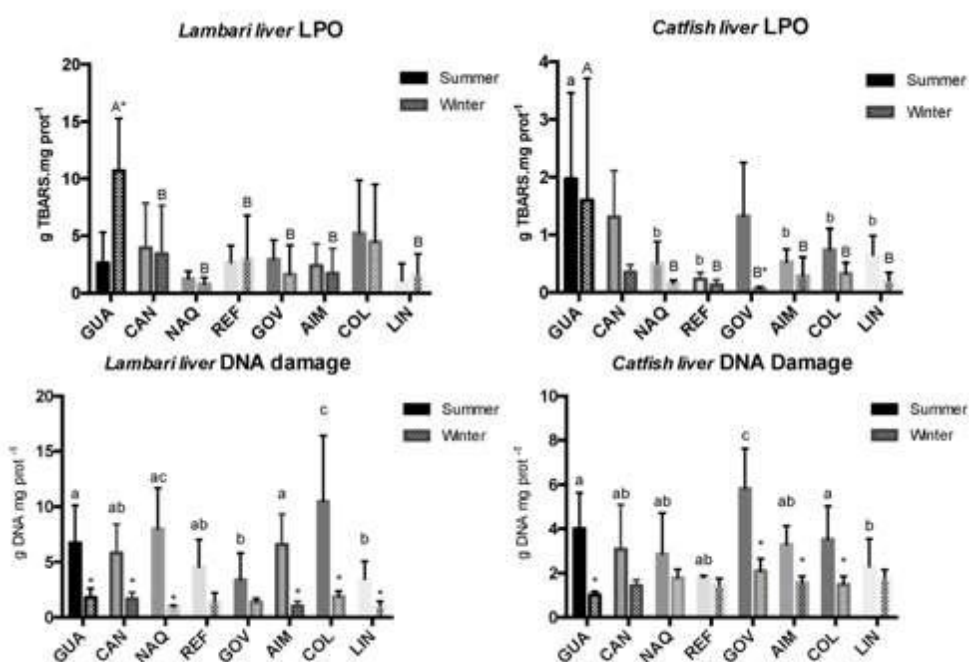
Peroxidação lipídica e Dano em DNA

Fígado

De modo geral, os níveis de lipídios peroxidados foram maiores tanto no fígado dos lambaris como dos bagres de GUA (inverno para ambos e verão para os bagres) com relação à maioria dos demais locais, principalmente NAQ, REF e AIM (Figura 19). Já para a análise de dano em DNA, verificou-se maiores fragmentos de DNA nos lambaris de COL e bagres de GOV (verão), sendo os níveis maiores no verão quando comparados

ao inverno para a maioria dos locais. Tanto a peroxidação lipídica, como a oxidação do DNA representam processos potencialmente catalizados pelo ferro ou outros metais redox-ativos devido à formação dos radicais hidroxilas, representando bons biomarcadores de estresse oxidativo para metais (Jomova & Valko, 2011; Valko et al., 2007). Em estudos de biomonitoramento, onde os organismos estão expostos à uma mistura de contaminantes ambientais e sob a influência de outros fatores abióticos, os danos em macromoléculas podem demonstrar efeitos mais relevantes do que as modulações na atividade das enzimas antioxidantes.

FIGURA 19. Peroxidação lipídica (LPO) e Danos no DNA no fígado de lambaris e bagres coletados no verão e inverno de 2019, nos oito pontos da bacia do Rio Doce.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

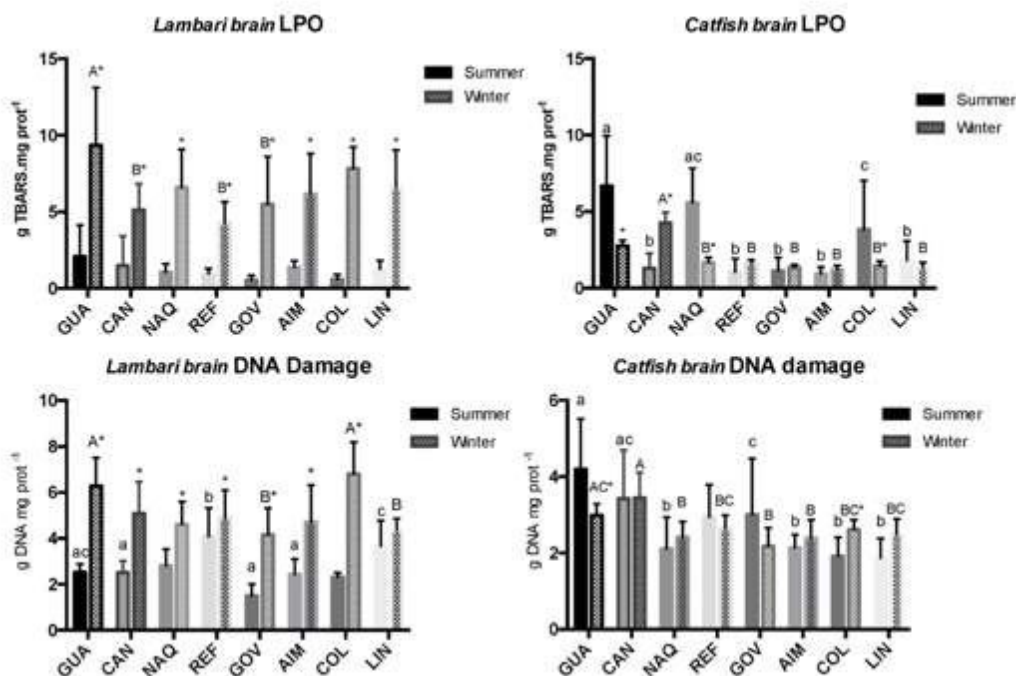
Cérebro

No cérebro observou-se um padrão semelhante ao do fígado para os níveis de LPO, onde os níveis foram maiores para os lambaris e bagres de GUA, sendo significativo nos lambaris do inverno e bagres do verão (Figura 20). Para ambas as espécies a peroxidação lipídica foi menor em REF, GOV e LIN e ao comparar as estações os níveis foram maiores no inverno para os lambaris. No DNA do cérebro houve maiores danos nos lambaris de GUA e COL (inverno) e bagres de GUA e CAN. Os menores níveis de

DNA fragmentado foram observados em lambaris de GOV e AIM e bagres de AIM, COL e LIN.

O cérebro pode ser um órgão-alvo de metais como o Hg, Mn, Pb e Fe, presentes no Rio Doce, pois são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e induzir o quadro de estresse oxidativo (Bressler & Goldstein, 1991; Fernsebner et al., 2014; Zheng et al., 2003). Muitas evidências apontam uma relação entre a exposição de metais de transição, o estresse oxidativo e a etiologia de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e, no caso do Pb, o saturnismo (Migliore & Coppedè, 2009).

FIGURA 20. Peroxidação lipídica (LPO) e Danos no DNA no cérebro de lambaris e bagres coletados no verão e inverno de 2019, nos oito pontos da bacia do Rio Doce.



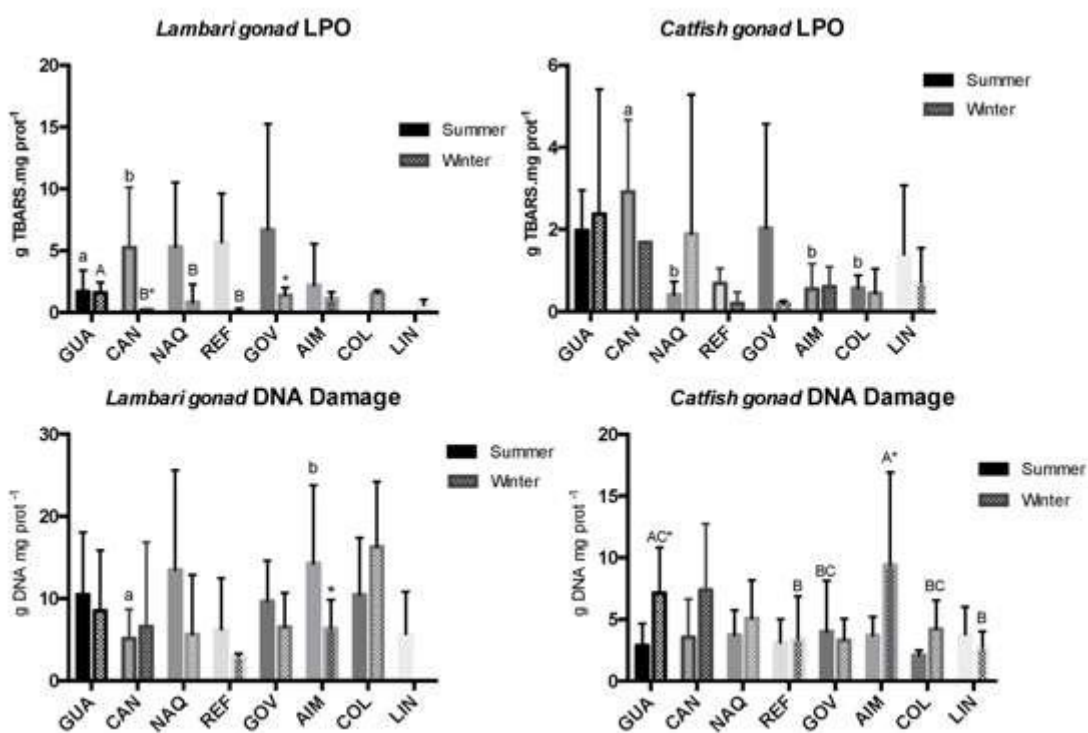
GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local

Gônadas

Nas gônadas, os maiores níveis de LPO foram detectados em lambaris de CAN (verão) e GUA (inverno) e bagres de CAN (verão). Com relação ao dano no DNA, observou-se maiores níveis nos lambaris e bagres de AIM (verão e inverno, respectivamente). Neste órgão foi observada uma grande variação dos níveis entre os indivíduos de um mesmo grupo ocasionando elevados desvios padrão e uma menor

diferença significativa entre os grupos (Figura 21). Além disso, observou-se diferença significativa sazonal, onde os níveis de LPO foram maiores nos lambaris do verão. Provavelmente estes resultados estão relacionados aos diferentes níveis lipídicos e de DNA entre as células dos gametas masculinos e femininos, sendo maiores as concentrações de lipídios em gametas femininos e a concentração de DNA nos gametas masculinos (principalmente em épocas reprodutivas). Para uma avaliação mais adequada destes resultados, será feita posteriormente uma análise comparativa entre os sexos feminino e masculino, quando for feita a confirmação do gênero de cada indivíduo através das análises histológicas das gônadas.

FIGURA 21. Peroxidação lipídica (LPO) e Danos no DNA nas gônadas de lambaris e bagres coletados no verão e inverno de 2019, nos oito pontos da bacia do Rio Doce.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

Ao comparar todos os 8 locais de amostragem da Bacia do Rio Doce, destacam-se as respostas observadas nos peixes coletados no Gualaxo do Norte: baixos níveis de GSH e da atividade da GST, assim como altos níveis de LPO no fígado dos bagres (verão e inverno) e lambaris (inverno); e maiores níveis de LPO no cérebro de lambaris (inverno) e bagres (verão), correlacionados com maiores danos no DNA deste órgão, principalmente no inverno ($R=0,63$ para lambaris; $R = 0,51$ para bagres, $p<0,001$,

TABELA 8). No fígado também houve uma correlação entre o dano em DNA e a LPO, porém esta foi mais significativa apenas nos lambaris. É possível que para estes peixes, os altos níveis de metais sejam responsáveis pela depleção da GSH e interferência no sistema de defesa antioxidante, o que explicaria os maiores níveis de danos nas biomoléculas, principalmente os lipídios. Com a integração dos dados através das análises multivariadas (PERMANOVA e PCA) a serem realizadas, será possível obter uma interpretação mais adequada para estas respostas.

TABELA 8. Análises de correlação (Spearman) entre as variáveis analisadas nos lambaris e bagres do Rio Doce coletados no verão e inverno de 2019.

Summer					
R Lambari	<i>liver</i> LPO	<i>liver</i> DNA	<i>brain</i> AChE	<i>brain</i> LPO	
<i>liver</i> DNA damage	0.42***				
<i>liver</i> GST	-0.32***	-0.41***			
<i>liver</i> GSH			0.33**		
<i>brain</i> DNA damage	-0.26*		0.34**	0.31**	
R Catfish	<i>liver</i> LPO	AMN	<i>brain</i> DNA damage		
<i>liver</i> LPO		0.244*	0.385***		
<i>liver</i> DNA damage	0.436***				
<i>liver</i> GST		-0.313**			
<i>brain</i> LPO		0.312**			
<i>brain</i> AChE			0.356**		
<i>gonad</i> LPO	0.368***	0.320**	0.363**		
Winter					
R Lambari	<i>brain</i> LPO	<i>liver</i> LPO	<i>liver</i> GST		
<i>liver</i> GSH		-0.305**	0.488***		
<i>gonad</i> LPO	0.305*		-0.278*		
<i>brain</i> AChE	0.306**				
<i>brain</i> DNA	0.637***	0.301**			
R Catfish	<i>liver</i> DNA damage	<i>liver</i> LPO	<i>liver</i> GST	<i>gonad</i> LPO	<i>brain</i> LPO
<i>liver</i> LPO	-0.361***		-0.298**	0.275	0.244
<i>liver</i> GSH	0.314**				-0.291*
<i>gonad</i> DNA damage				0.570***	
<i>brain</i> AChE			-0.442***		-0.307**
<i>brain</i> LPO	-0.406***	0.244*	0.282**	0.289*	
<i>brain</i> DNA	-0.284**	0.252*			0.513***
<i>muscle</i> AChE		0.381***	-0.285**		
AMN	-0.397**		-0.415**		

*p<0,05

**p<0,01

***p<0,001

A indução do sistema de defesa antioxidante, com aumento da atividade da SOD e CAT foi observada no fígado de peixes (traíra e casudo) coletados no Alto Rio Doce em 2018 e associada aos altos níveis de Fe e Mn na água e Pb, Ni e As sedimento, quando

comparado ao local referência no Rio Piranga (Weber et al., 2020). Este único estudo com a utilização de biomarcadores bioquímicos em peixes do Alto Rio Doce, também demonstrou uma maior incidência de alterações histopatológicas no fígado, como a necrose, maior expressão da CYP1A e metalotioneína através de imunohistoquímica, porém não verificou diferenças significativas para os níveis de GSH e nem para os índices hepatossomático e fator de condição.

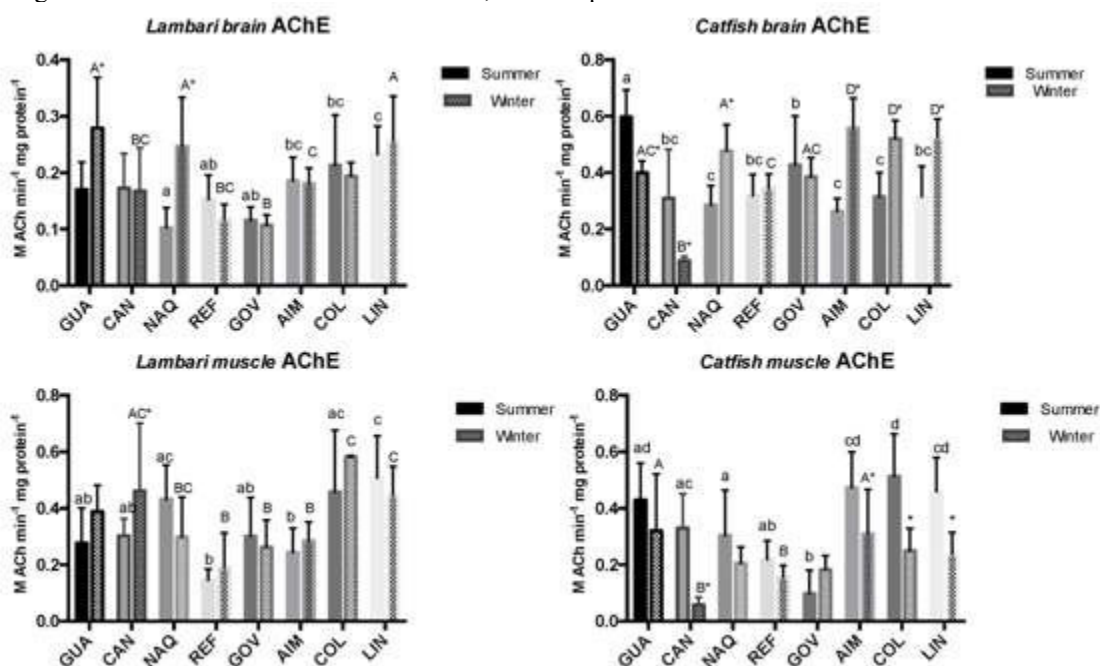
Ainda nos peixes do Alto Rio Doce, coletados no reservatório de Candonga, observou-se maiores níveis de LPO no cérebro dos bagres do inverno, e nas gônadas dos peixes do verão. Porém, para os peixes deste grupo observou-se maiores diferenças significativas ao comparar as estações de verão e inverno. Possivelmente este local sofra maior influência da sazonalidade por se tratar de um reservatório onde seus níveis podem estar sujeitos à uma maior variação em função da pluviosidade.

No médio Rio Doce, onde se encontram as atividades siderúrgicas e o lançamento de esgoto não tratado, como principais fontes poluidoras na região, destaca-se a cidade de Governador Valadares, local onde observou-se que os bagres apresentaram maior dano no DNA no fígado. Diversos tipos de contaminantes introduzidos neste ambiente, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros poluentes orgânicos, podem induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos.

De modo geral, o ponto Referência apresentou menores níveis de LPO em todos os órgãos analisados, tanto para os lambaris, como bagres. Porém, algumas alterações inesperadas também foram observadas neste grupo, como os danos em DNA no cérebro dos lambaris do verão. Este local foi selecionado como referência por estar sujeito à um menor impacto de atividades antrópicas, por se tratar de uma área de preservação ambiental, e não ter sido afetado diretamente pela onda de rejeitos do minério de ferro. Porém, durante o inverno de 2019 (estação seca), foi observada algumas regiões de queimada, as quais podem representar fontes naturais de compostos potencialmente tóxicos, como os HPAs de origem pirogênica. Também não deve ser descartada a possibilidade de migração dos peixes do Rio Doce para o Rio Corrente, pois apesar da distância considerável entre os pontos de amostragem, não há barreiras físicas que impeçam o deslocamento. Portanto, será necessário aguardar os resultados das análises químicas para uma discussão sobre a possível presença de contaminantes nesta região e um melhor esclarecimento destes questionamentos.

Com relação aos peixes do Baixo Rio Doce (AIM, COL e LIN), a principal resposta observada foi uma maior atividade da enzima AChE tanto no cérebro, como no músculo. Para os peixes do verão, houve uma correlação positiva entre a atividade da AChE cerebral e dano em DNA neste órgão ($R>0,3$; $p<0,01$), enquanto para os peixes do inverno a correlação foi obtida entre a AChE e LPO no cérebro. Apesar da AChE não estar relacionada com o sistema de defesa antioxidante celular, é possível que um dano celular decorrente da oxidação de moléculas como os lipídios e DNA pudesse afetar a atividade de enzimas como a AChE, e que estas respostas estejam relacionadas à uma provável ocorrência de poluentes como os pesticidas, na região. A manutenção da integridade celular é essencial para o funcionamento adequado desta enzima, já que sua atividade depende da interação direta com neurotransmissores que se ligam a receptores transmembranares e a secreção de vesículas destas moléculas depende de um mecanismo de sinalização regulatório.

FIGURA 22. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo de lambaris e bagres coletados no verão e inverno de 2019, nos oito pontos da bacia do Rio Doce.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

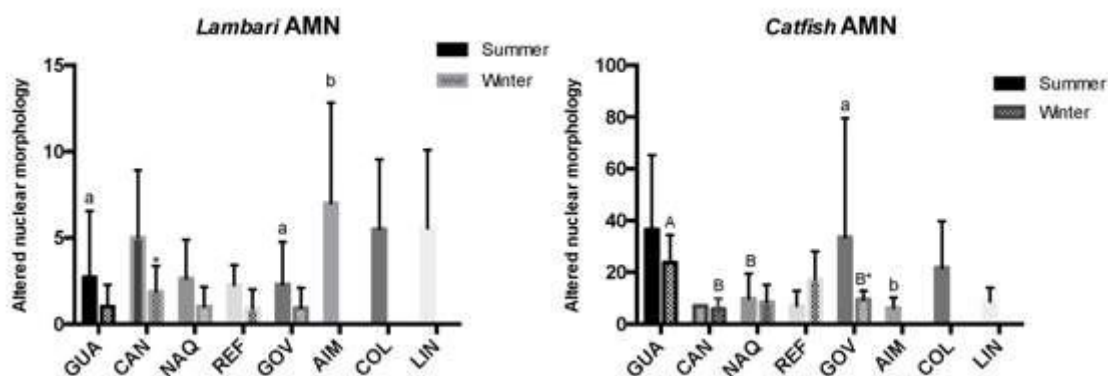
Através das análises de correlação entre os biomarcadores (TABELA 10), foi possível observar que os bagres do inverno apresentaram um maior número de

correlações significativas de respostas (11 com $R>0,3$) quando comparados aos bagres do verão (8 com $R>0,3$) e lambaris (verão e inverno com 7 e 6 $R>0,3$, respectivamente). Possivelmente estas respostas estejam relacionadas à disponibilidade dos contaminantes na estação de seca e ao hábito alimentar/nicho dos bagres. O inverno corresponde à época de seca na região do Rio Doce, resultando em menores níveis de profundidade do rio, assim como uma velocidade de fluxo menor. Com esta diminuição no fluxo do rio há menor ressuspensão do sedimento, e consequentemente maior deposição de partículas em suspensão da coluna d'água para o sedimento. Os bagres, por serem peixes que ficam em contato com o sedimento podem estar mais susceptíveis à exposição de contaminantes presentes neste compartimento.

Genotoxicidade

Mesmo ainda não tendo sido finalizada a análise morfológica nuclear dos eritrócitos (falta os grupos, AIM, COL e LIN do inverno), já foi possível observar que os lambaris (verão) do Baixo Rio Doce apresentaram mais alterações quando comparados aos demais grupos (Figura 23). Por outro lado, nos bagres, onde a frequência de alterações foi significativamente maior que nos lambaris, observaram-se anormalidades nucleares mais frequentes nos eritrócitos dos bagres de GUA (verão e inverno) e GOV (verão).

FIGURA 23. Escore das alterações morfológicas nucleares (AMN) nos eritrócitos de lambaris e bagres coletados no verão e inverno de 2019, nos oito pontos da bacia do Rio Doce.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

Na região do Alto Rio Doce (GUA), onde há maiores concentrações de metais decorrentes das atividades de mineração, é provável que a exposição a alguns destes elementos, como Al, Pb, Cd, Fe e Cr possa desencadear no aumento da oxidação do DNA, induzindo efeitos mutagênicos e carcinogênicos (ATSDR, 2013, 2007; Kumar et al., 2014; Satarug et al., 2009). Tanto pela capacidade de aumentar a produção de radicais hidroxilas como pelas propriedades inerentes de ligação ao DNA, estes metais podem alterar a conformação ou até mesmo induzir à quebra das fitas. Em células da linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano) expostas à água e lama de Bento Rodrigues (Rio Gualaxo do Norte) coletados 13 dias após o acidente em 2015, foi observada a inibição do crescimento celular, aumento da frequência de micronúcleos e do dano em DNA, através do ensaio Cometa (Segura et al., 2016). De forma semelhante, *Allium cepa* expostos às mesmas condições, demonstraram diminuição na taxa de germinação e do índice mitótico, além do aumento da citotoxicidade, quando comparados ao controle negativo. De acordo com este estudo, estes efeitos mutagênicos provavelmente estão relacionados às altas concentrações de Fe, Mn detectados na água e na lama, assim como à presença de outros metais como Al, Pb, Cr e Zn.

Além dos contaminantes inorgânicos, outros compostos orgânicos, como os HPAs e agrotóxicos, também podem apresentar potencial genotóxico. As alterações mutagênicas observadas nos eritrócitos dos peixes de GOV e do baixo Rio Doce, podem ser decorrentes da exposição à mistura destes contaminantes orgânicos e dos metais distribuídos ao longo do Rio Doce. De acordo com Gomes et al. (2019) a exposição de apenas 96h à água do Rio Doce coletada em Colatina logo após o acidente, foi capaz de induzir efeitos genotóxicos, como o aumento de micronúcleos e danos no DNA, nos eritrócitos de carás (*Geophagus brasiliensis*). Outro estudo também mostra efeitos citogenotóxicos, como as alterações nas fases das divisões celulares e aumento de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* exposto à água do Rio Doce coletada 10 dias após o desastre, no médio Rio Doce (Ipatinga e Governador Valadares) (Quadra et al., 2019). Ambos os estudos apontam os metais como prováveis responsáveis pelos efeitos genotóxicos observados, porém não deve ser negligenciada a influência de outros contaminantes orgânicos nestas respostas, provavelmente presentes na região.

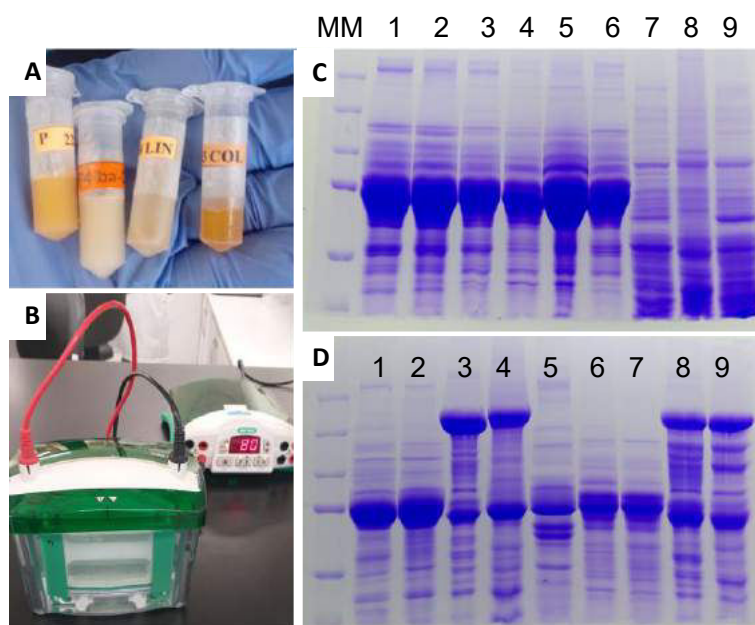
Análises Moleculares

Detecção da expressão da Vitelogenina em peixes do Rio Doce

Através do ensaio de Western Blotting foi possível detectar a vitelogenina em amostras de bagres fêmeas e de machos do Rio Doce, com o uso dos soros contendo anticorpos anti-vtg de cará (*Geophagus brasiliensis*, Yamamoto et al., 2017), anti-vtg de jundiá (*Rhamdia quelen*, Moura Costa et al., 2016) e um anticorpo anti-vtg recombinante produzido no laboratório de Toxicologia Celular (UFPR, Folle, 2018). As amostras de bagres mostraram diferentes reações de acordo com a espécie testada e o tipo do anticorpo usado, marcando bandas acima de 100 kDa para os anticorpos dos soros anti-cará e anti-jundiá, enquanto que o uso do anticorpo anti-vtg recombinante marcou bandas de aproximadamente 75 kDa.

A coloração dos géis de SDS-PAGE com azul de Coomassie mostrou a integridade e perfil das proteínas do plasma, permitindo a continuidade da análise por Western blotting (FIGURA 24).

FIGURA 24. Amostras de plasma e a separação das proteínas de diferentes tamanhos através da técnica de Eletroforese SDS-PAGE

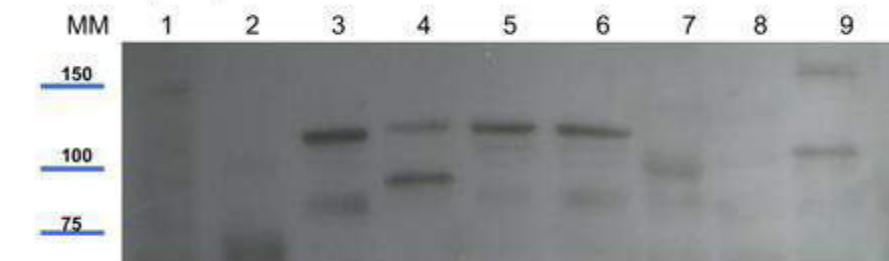


A - Amostras de plasma dos peixes do Rio Doce; B - Cuba de eletroforese (Mini Protean Tetra Cell, Bio-rad) submetida à corrente elétrica de 20 mA por gel C -Separação das proteínas e visualização das bandas através da coloração com corante azul de Coomassie. Observe o diferente padrão das bandas formadas entre as espécies de mandis (C7 a 9; D5 a 7), jundiás (C2, C3D1, D2) e cascudos (D3,D4,D8,D9), que apresentam maior concentração de proteínas maiores.

Foram testadas amostras de plasma (contendo 60 mg de proteínas por poço do gel), das cinco espécies de peixes coletadas no Rio Doce: 1- cascudo (*Loricariichthys castaneus*); 2 – Cumbaca (*Trachelyopterus striatulus*); 3 – Mandi (*Pimelodus maculatus*); 4 – Jundiá (*Rhamdia quelen*); 5 – cará (*Geophagus brasiliensis*), sendo possível detectar apenas a vitelogenina dos mandis, jundiás e carás, não havendo detecção para os cascudos e cumbacas (FIGURA 25) com os anticorpos usados. Para a detecção da vitelogenina dos mandis, espécie com maior número amostral nesta análise, verificou-se uma reação mais específica com o uso do soro anti-cará, marcando bandas de aproximadamente 120 kDa. Em alguns indivíduos também foi evidenciada uma banda menor de aproximadamente 90 a 100 kDa, representando uma possível isoforma distinta (vitelogenina incompleta) da vitelogenina de 120 kDa, onde há menos domínios que a forma completa da vitelogenina. Apesar de não haver nenhum estudo caracterizando a vitelogenina do mandi, o que permitiria uma confirmação dos dados obtidos, a especificidade do anticorpo já foi verificada em estudos prévios com a sua aplicação em outras espécies considerando controles negativos e positivos, sugerindo que a banda marcada é a da vitelogenina.

FIGURA 25. Teste com os soros policlonais contendo anticorpos anti-vitelogenina de cará e jundiá, através da técnica de Western blotting

TESTE ac cará (1:3000)



1 – Cascudo fêmea; 2 – Cumbaca fêmea; 3, 5 e 6 – Mandis fêmeas; 4 – Mandi macho; 7 e 8 – Jundiás machos induzidos; 9 – Jundiá macho controle negativo

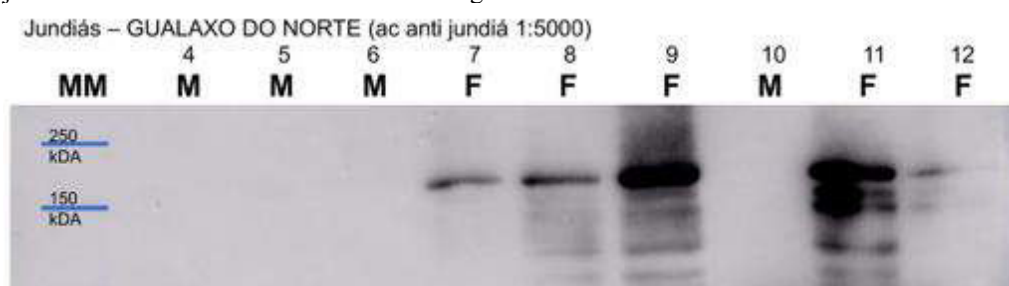
TESTE ac cará (1:3000)



1 – Tilápia macho induzido; 2 – Tilápia macho controle; 3 – Jundiá macho induzido; 4 – Jundiá macho; 5 – Albumina purificada; 6 – Cascudo fêmea; 7 – Cará fêmea; 8 – Traira; 9 – Cará macho

Para as amostras de jundiá, o anticorpo mais adequado foi o do soro do próprio jundiá, apesar de ser necessária uma diluição maior deste para diminuir as reações inespecíficas com outras proteínas (Figura 26). A especificidade dos anticorpos usados também foi verificada com uma amostra de albumina bovina purificada, uma das proteínas mais abundante no plasma dos peixes, não havendo reação cruzada para nenhum dos anticorpos. Apesar de uma aparente inespecificidade maior do antissoro de jundiá, onde há a marcação de outras bandas, foi possível detectar a vitelogenina plasmática apenas nas fêmeas dos jundiás (banda próxima de 150 kDa), para os peixes do Gualaxo do Norte. Portanto, nenhum macho de jundiá demonstrou a expressão da vitelogenina e o anticorpo demonstrou-se eficaz ao detectar a vitelogenina em fêmeas e por não gerar potenciais resultados falsos positivos.

FIGURA 26. Detecção da expressão da vitelogenina dos jundiás do Rio Doce com soro policlonal anti-jundiá através da técnica de Western blotting



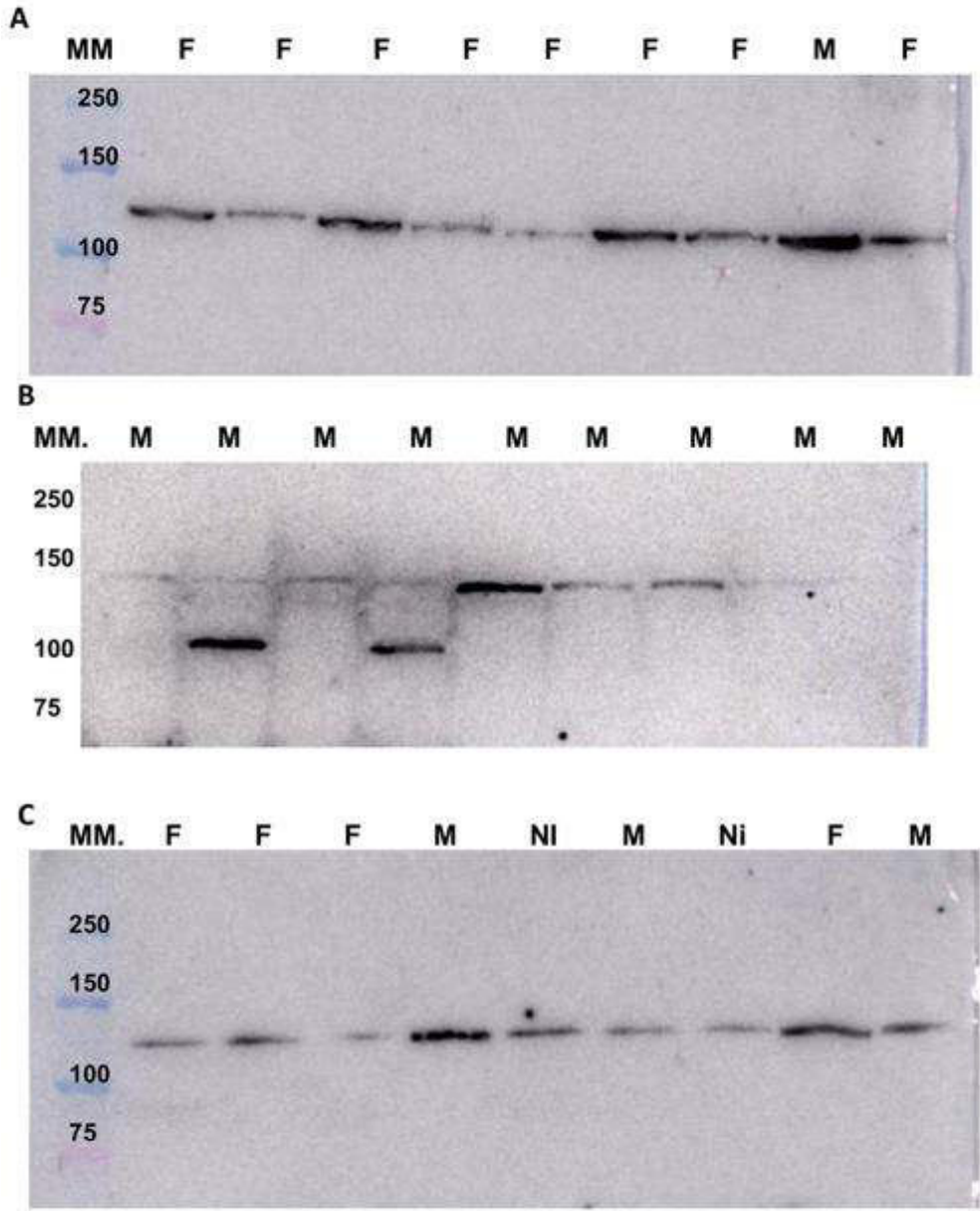
Amostras de plasma de fêmeas (F) de jundiás expressando a vitelogenina (aproximadamente 200 kDa), não havendo reação para as amostras de machos (M)

Por outro lado, as amostras do plasma do mandi demonstraram uma reação mais específica com o antissoro do cará, onde foi possível detectar uma banda de 120 kDa e outra de aproximadamente 90 kDa (Figura 27). Para a maioria dos grupos testados, foi possível detectar a presença da vtg em pelo menos 1 a 3 amostras de machos, tanto para as coletas do verão, como para as do inverno. Nos locais onde foram capturados mais machos, como em Naque e Linhares, foram identificados até 3 machos com expressão significativa da vitelogenina plasmática (TABELA 9).

Conforme esperado, a maioria das fêmeas dos mandis e jundiás demonstraram expressão da vitelogenina em todos os pontos analisados. Apesar do Western blot ser considerada uma técnica qualitativa de menor sensibilidade, foi possível verificar níveis de expressão distintos entre os indivíduos e no geral, maiores níveis detectados nas fêmeas do que em machos. Na maioria dos indivíduos foi possível detectar apenas uma

banda de 120 kDa, porém para alguns observou-se também outro monômero de aprox. 90 kDa.

FIGURA 27. Detecção da expressão da vitelogenina dos mandis do Rio Doce com soro policlonal anti-cará através da técnica de Western blotting



Amostras de plasma de fêmeas (F) e machos (M) expressando a vitelogenina (aproximadamente 125 kDa e 100 kDa)

TABELA 9. Detecção da vitelogenina plasmática nos bagres do Rio Doce através da técnica de Western blotting.

Summer	Species	N	VTG Male	VTG Female	VTG Ni
GUA	Jundiá	14 (9F; 5M)	-	7 (77%)	
CAN	-				
NAQ	Mandi	7 (4F; 2M)	2 (100%)	4 (100%)	
REF	Mandi	1 (1F)	0	1 (100%)	
GOV	Mandi	9 (3F; 3M; 3 NI)	3 (100%)	3 (100%)	
AIM	Mandi	2 (1M; 1 NI)	0	-	
COL	Mandi	12 (6F; 1 M; 5 NI)	1 (100%)	6 (100%)	3
LIN	Mandi	9 (4F; 2M; 3NI)	2 (100%)	4 (100%)	2
Winter					
GUA	Jundiá	9 (5F; 4M)	-	3 (60%)	
CAN	Cará	4 (4M)	1		
NAQ	Mandi	11 (4F; 6M; 1NI)	3 (50%)	4 (100%)	1
REF	Mandi	14 (11F; 2M; 1NI)	1 (50%)	10 (90%)	
GOV	Mandi	10 (8F; 2M)	2 (100%)	8 (100%)	
AIM	Mandi	9 (4F; 3M; 2NI)	2 (66%)	4 (100%)	1
COL	Mandi	13 (8F; 3M, 2NI)	2 (66%)	8 (100%)	
LIN	Mandi	15 (9F; 6M)	3 (50%)	5 (55%)	

F – Fêmeas; M – Machos; NI – Sexo não identificado

A vitelogenina é uma proteína complexa de alto peso molecular. Para a maioria das espécies de peixes na literatura seu tamanho chega a ser superior à 300 kDa, sendo formada por dois homodímeros que apresentam cadeias lineares compostas de grupos fosfatos, carboidratos e lipídídicos (Marin & Matozzo, 2004; Matozzo et al., 2008; Sumpter & Jobling, 1995). As formas completas da vitelogenina apresentam cinco domínios distintos: Cadeia pesada Lipovitelina -N-terminal (LvH); fosfovitina(Pv); cadeia leve da lipovitelina (LvL); componente - β ; e peptídeo C-terminal carboxi terminal (Ct) (Hara, Hirano, Shimizu, & Fukada, 2007; Hiramatsu, Cheek, Sullivan, Matsubara, & Hara, 2005). O maior domínio da vtg, a cadeia pesada da lipovitelina, apresenta uma massa média de 115 kDa, enquanto a cadeia leve apresenta 25 kDa. Com a separação através de SDS-PAGE, a maior parte dos monômeros descritos fica entre 100 a 200 kDa, havendo dois ou mais tamanhos distintos de acordo com a espécie (Yilmaz, Patinote, Nguyen, & Bobe, 2018; Yilmaz et al., 2015).

Além do importante papel nutricional da vitelogenina para os embriões em desenvolvimento, muitas evidências mostram sua capacidade como uma molécula imunoprotetora, combatendo patógenos como vírus e bactérias (Zhang, Dong, & Cui,

2015). Os domínios da fosfovitina e lipovitelina são capazes de reconhecer e se ligar às membranas de bactérias gram-positivas e gram-negativas lisando suas células ou facilitando o processo de fagocitose pelos macrófagos. Estas funções protetivas da vitelogenina se aplicam tanto durante a maturação dos ovócitos como ao desenvolvimento embrionário (Sullivan & Yilmaz, 2018).

Apesar dos diferentes papéis da vitelogenina, a sua síntese em peixes machos ou juvenis é muito reduzida devido aos baixos níveis de estradiol plasmático. Quando detectada em níveis significativos, representa um grande indicativo da exposição a compostos desreguladores endócrinos capazes de interagir com receptores estrogênicos ou que interferem na esteroidogênese (Arukwe & Goksøyr, 2003; Nagler, Davis, Modi, Vijayan, & Schultz, 2010). Por isso, a vitelogenina representa um biomarcador de estrogenicidade bem descrito e amplamente utilizado em diversos estudos de biomonitoramento (Desforges et al., 2010; Gilannejad et al., 2016; Reinen et al., 2010).

Mesmo havendo um número amostral baixo de machos para a maioria dos pontos, foi possível detectar a expressão da vitelogenina na maior parte destes indivíduos (TABELA 11, Figura 27). Em alguns indivíduos o sexo ainda não foi determinado, pois aguarda a confirmação através da análise histológica das gônadas. Após esta confirmação o número de indivíduos machos (ou juvenis) pode aumentar e influenciar nos resultados obtidos nesta análise.

É possível que um maior número de indivíduos machos coletados no Médio e Baixo Rio Doce estejam produzindo mais vitelogenina do que os peixes do Alto Rio Doce, devido à maior ocorrência de desreguladores endócrinos estrogênicos naquelas regiões. Os efluentes domésticos são uma das principais fontes de poluentes orgânicos, como hormônios estrogênicos, farmacêuticos entre outros considerados como desreguladores endócrinos (Andersen et al., 2003; Huerta et al., 2015; Vázquez et al., 2009). Atividades industriais e agrícolas também podem introduzir compostos como HPAs e pesticidas que demonstram atividade estrogênica em diversos organismos (Fernandes & Porte, 2013; Hass et al., 2012; Jacobsen et al., 2010; Kennedy & Smyth, 2015). Além disso, resíduos da agropecuária, também são responsáveis pela liberação considerável de hormônios e outras substâncias consideradas disruptoras endócrinas. Já os metais, mais abundantes no Alto Rio Doce, demonstram menor potencial para efeitos estrogênicos quando comparados aos contaminantes orgânicos (Huang, Ying, Liang, Liu,

& Liu, 2014). É importante destacar que alguns peixes machos coletados no ponto referência também demonstraram expressão da vitelogenina, sendo ideal a comparação com organismos da mesma espécie coletados em outros ambientes aquáticos, para a compreensão dos níveis basais produzidos sem haver a influência destes contaminantes.

A vitelogenina também pode ser utilizada como um biomarcador para anti-estrogenicidade, quando detectada em menores níveis nas fêmeas ovíparas em época reprodutiva (Nicolas, 1999). Neste caso, pode representar uma resposta ecologicamente relevante uma vez que a interferência na sua síntese pode acarretar no desenvolvimento dos ovócitos e afetar nos processos reprodutivos. Porém é necessário distinguir estes efeitos entre desreguladores endócrinos e hepatotóxicos, uma vez que a toxicidade no fígado também é capaz de modular os níveis de síntese da vitelogenina (Baumann et al., 2020). Por isso faz-se necessário o uso de outros biomarcadores de desregulação endócrina e de hepatotoxicidade para esclarecer estes mecanismos.

Diversos contaminantes demonstram potenciais estrogênicos quando organismos são expostos à concentrações elevadas, porém ainda permanece a ser investigado se estes efeitos podem ser desencadeados em concentrações ambientais através de exposições crônicas (Diamanti-Kandarakis, 2009; WHO, 2012). Para o cará e o jundiá há poucos estudos que quantificaram sua expressão em indivíduos capturados em outras bacias hidrográficas (Santos et al., 2016; Osório et al., 2014; Yamamoto et al., 2017). Já para o mandi, este é o primeiro estudo que demonstra a detecção da vitelogenina nesta espécie, o que reforça a importância deste tipo de estudo considerando espécies nativas brasileiras.

ELISA VTG

A técnica de Elisa não demonstrou resultados satisfatórios para a detecção da vtg com o uso do anticorpo anti-vtg recombinante e a vtg recombinante purificada. O Ensaio de ELISA não obteve sucesso neste estudo provavelmente devido aos seguintes fatores:

- Vtg recombinante purificada demonstrou-se “degradada”, através da técnica de SDS-PAGE e Western blotting, provavelmente devido ao congelamento e descongelamento da amostra e o período de armazenamento (mesmo em -80° C), sendo provavelmente necessária a purificação de mais vtg recombinante ou de vtg purificada de outras espécies para o desenvolvimento do ensaio de ELISA.

- Ligação entre vtg recombinante e o anticorpo anti-vtg recombinante é muito mais forte que a ligação entre anticorpo anti-vtg recombinante e a vtg endógena dos peixes (tilápia, jundiá, mandis), o que dificulta estabelecer uma diluição adequada do anticorpo e das amostras, assim como uma comparação da absorbância com a da curva padrão obtida com os valores de vtg-recombinante (para o ensaio de ELISA por competição). Neste método é ideal que a vtg purificada a ser utilizada na curva padrão seja uma vtg da mesma espécie a ser testada, ou que pelo menos o anticorpo tenha um padrão de afinidade semelhante para a vtg purificada e a vtg endógena da amostra a ser testada (ex: para as amostras do plasma do cará analisadas de acordo com Yamamoto et al. (2017), o ELISA funcionou bem pois foi utilizada vtg purificada do cará e anticorpo anti-cará).

Histopatológicos

Brânquias - MEV

Alguns indivíduos apresentaram brânquias com morfologia normal, tanto dos lambaris como dos bagres, com lamelas regularmente espaçadas e células pavimentosas poligonais delimitadas pelas microdigitações, com contornos bem definidos (Figura 28). As células pavimentosas apresentam diversos papéis relevantes para as brânquias, entre eles a osmoregulação, controlando o volume celular através das trocas iônicas, a respiração com a troca de O₂ e CO₂ e também o metabolismo de xenobióticos presentes na água através de suas enzimas de biotransformação (Leguen et al., 2001). Além das células pavimentosas também foi possível visualizar, na camada superficial do epitélio branquial, as células de cloreto (células ricas em mitocôndrias) através de seus orifícios na região apical e as células mucosas com a liberação de glóbulos de muco. Esta produção do muco pode estar relacionada com funções protetoras agindo como uma barreira física contra partículas suspensas na água durante a ventilação, assim como uma barreira imunológica contra patógenos (Isabelle Leguen, 2018). Já, o excesso na produção do muco pode ser uma resposta à exposição aos poluentes presentes na água (Salamat et al, 2013).

De fato, as brânquias são consideradas primeiros alvos dos poluentes pelo seu contato direto com o ambiente aquático. Através da microscopia eletrônica de varredura das brânquias, foi possível visualizar diferentes alterações histopatológicas neste estudo, como as fusões lamelares, alterações na morfologia das microdigitações, hiperplasia,

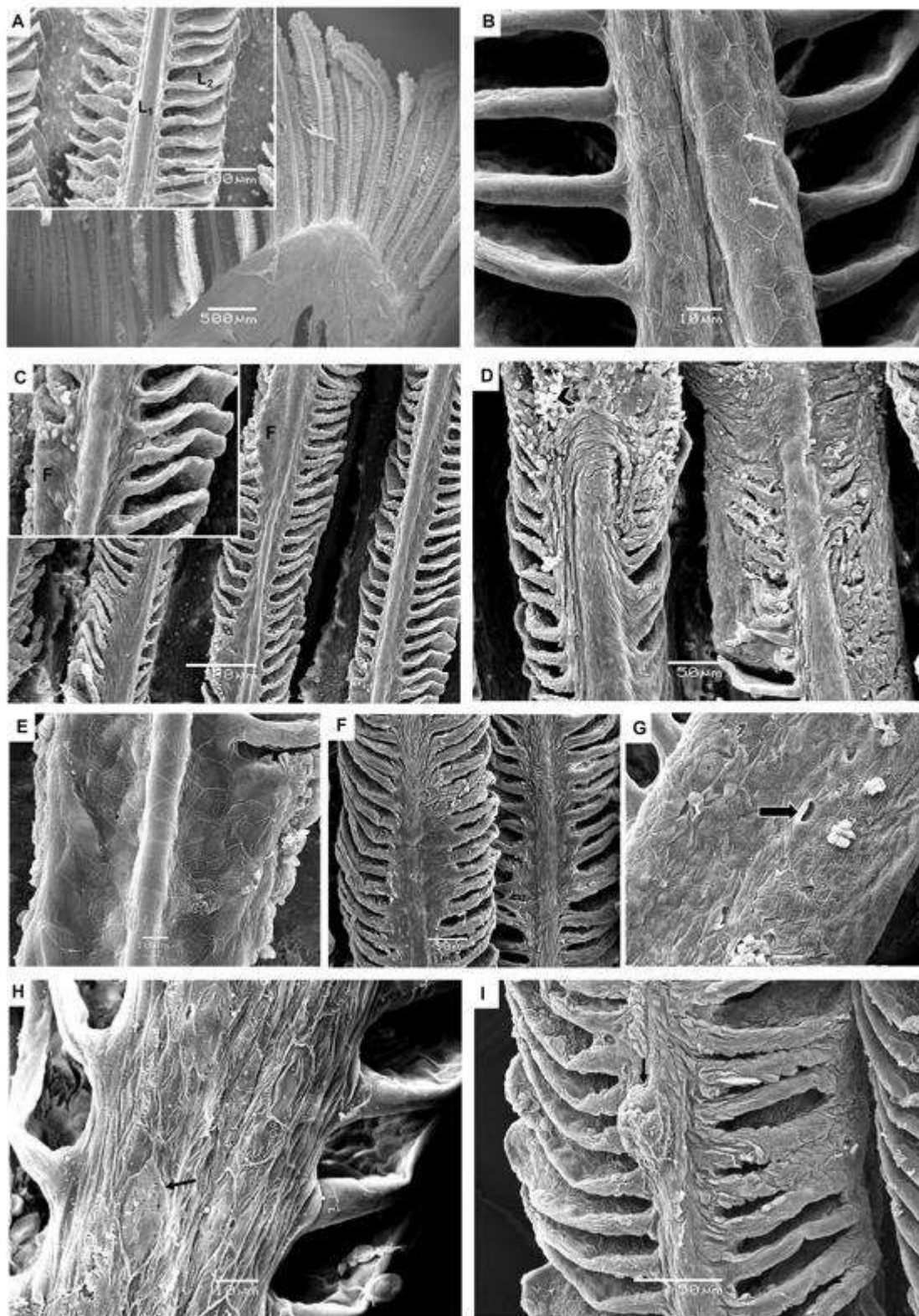
aneurismas, neoplasia, necrose, descamação do epitélio da lamela primária, alterações estruturais das lamelas primárias e secundárias e a ocorrência de parasitas (Figuras 28 e 29). Anormalidades como as alterações nas microvilosidades e hipertrofia de células de cloreto, com o aumento das suas aberturas na superfície epitelial, também foram observadas nas brânquias de peixes coletados próximos à uma mineradora de ouro na Rússia, com altas concentrações de Hg, Cd, Fe e Zn no sedimento et al., 2004). Para os lambaris do verão, as alterações mais frequentemente observadas foram nas microdigitações e neoplasia das células pavimentosas e alterações estruturais nas lamelas primárias e secundárias, principalmente nos peixes de Gualaxo do Norte, Aimorés, Colatina e Linhares (TABELA 10). De modo geral, os lambaris do ponto referência, Governador Valadares, Candonga e Naque, apresentaram menor incidência de alterações, nesta ordem. Além destas alterações, foi possível verificar a ocorrência do desprendimento do epitélio branquial da lamela primária nos peixes do Baixo Rio Doce (AIM - 40%; COL – 50%; LIN – 20%) e parasitas apenas em um indivíduo de NAQ e AIM. Por fim, foi visualizada uma estrutura pontiaguda não identificada, possivelmente um receptor sensorial, presente em 36% de todos os indivíduos analisados, em lambaris de GUA, REF, GOV, AIM e COL (Figura 30).

Mesmo não tendo sido finalizadas as análises das amostras dos bagres do verão, foi possível identificar as mesmas alterações visualizadas nos lambaris, porém estas foram menos incidentes. Apesar dos peixes do ponto referência também apresentarem algumas alterações, como a hiperplasia, neoplasia e alterações na estrutura das lamelas, estas foram mais frequentes nos peixes do Gualaxo do Norte e Candonga (carás). A ocorrência de fusão lamelar foi observada apenas nos lambaris de GUA, AIM, COL e LIN.

Tabela 10. Frequência das alterações histopatológicas observadas nas brânquias dos lambaris e bagres do Rio Doce coletados no verão de 2019.

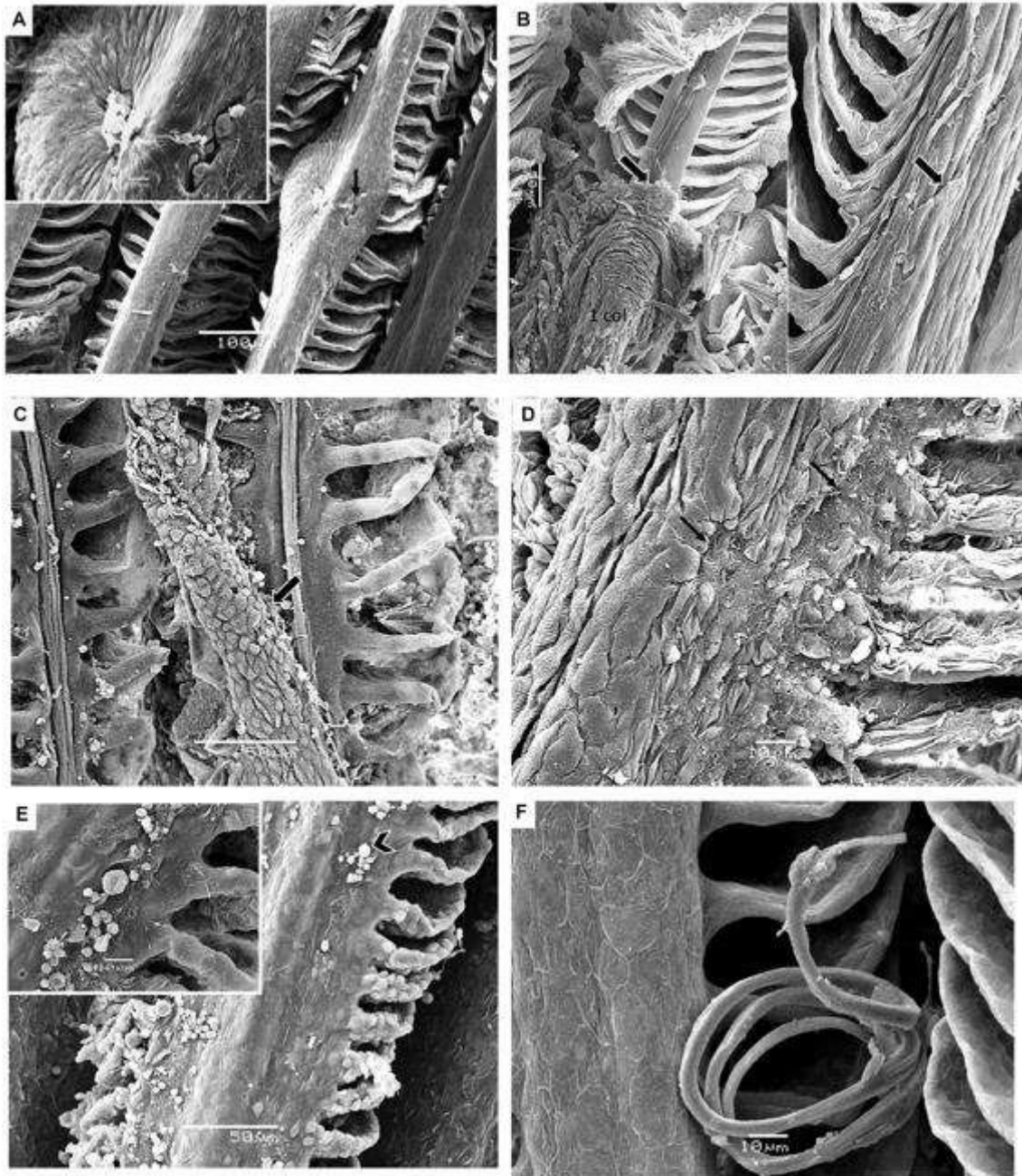
Lambaris Summer 2019							
	Lamelar fusion	Hiperplasy	Neoplasia	Necrosis	Interridge	1 st Filament Structure	2 nd Filament Structure
GUA	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)	2 (40%)	4 (80%)	5 (100%)	4 (80%)
CAN	0	0	2 (40%)	3 (60%)	4 (80%)	3 (60%)	2 (40%)
NAQ	0	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
REF	0	0	0	1 (10%)	1 (10%)	1 (33%)	0
GOV	1 (20%)	1 (20%)	0	9	4 (80%)	3 (60%)	1 (20%)
AIM	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	4 (80%)	3 (60%)
COL	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)
LIN	3 (75%)	4 (100%)	3 (75%)	2 (50%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)
Bagres Summer 2019							
	Lamelar fusion	Hiperplasy	Neoplasia	Necrosis	Interridge	1 st Filament Structure	2 nd Filament Structure
GUA	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	2 (40%)	2 (60%)	4 (80%)	3 (60%)
CAN	3 (60%)	3 (60%)	2 (40%)	1 (20%)	5 (100%)	4 (80%)	3 (60%)
REF	2 (40%)	3 (60%)	1 (20%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (40%)	1 (20%)

FIGURA 28. Micrografia das brânquias dos lambaris do Rio Doce coletados no verão de 2019.



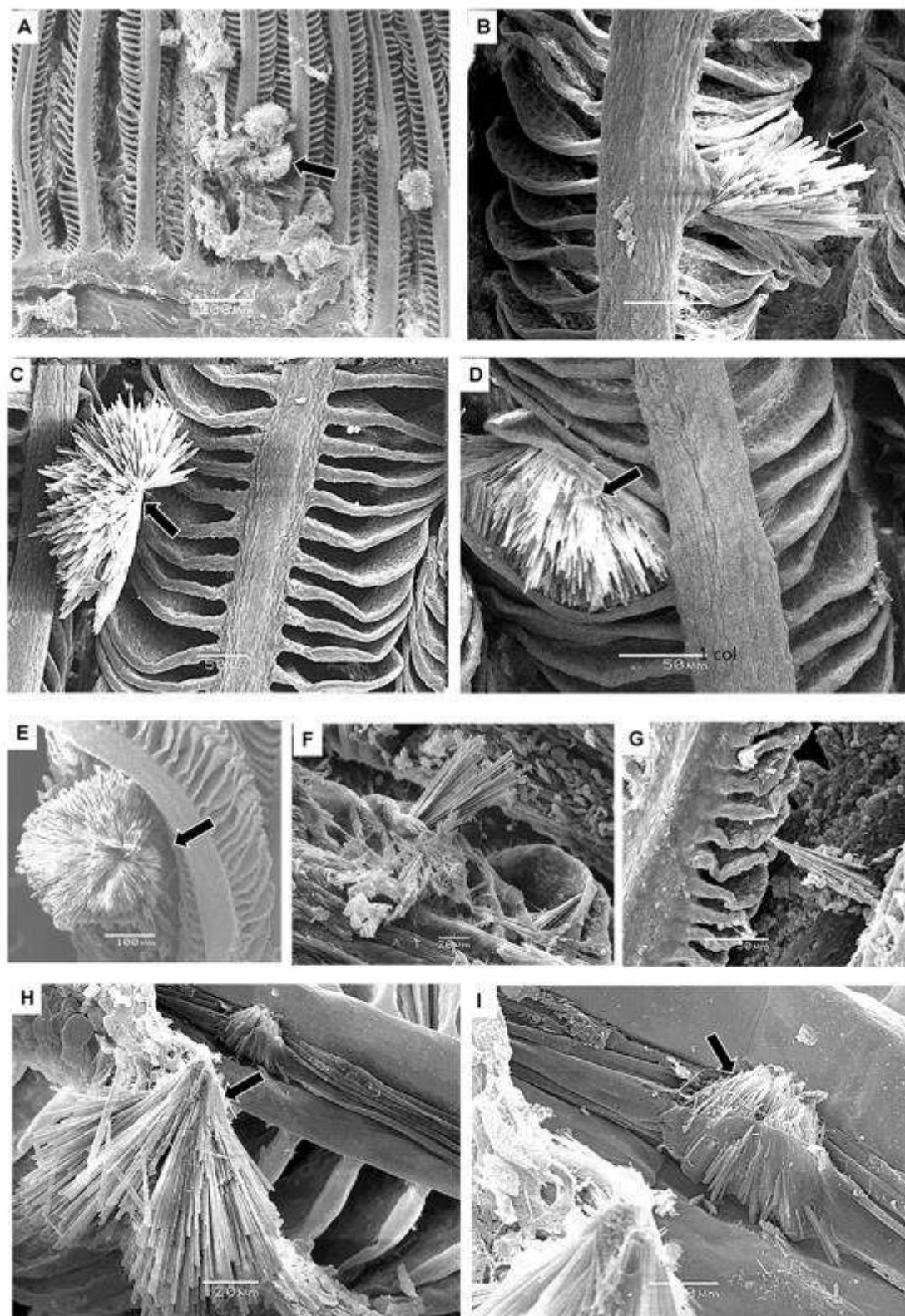
A – Brânquias de lambari de REF sem alterações morfológicas com lamelas primárias (L₁) e lamelas secundárias (L₂) bem definidas e espeçadas regularmente. B – Detalhe das microdigitações delimitando as células pavimentosas das lamelas primárias. C-F – Fusão lamelar das lamelas secundárias. D e F – Alterações estruturais das lamelas primárias e secundárias. G – Orifício acentuado das células de cloreto. H – Alterações nas microdigitações. I – Formação de um tumor na lamela primária

FIGURA 29. Micrografia das brânquias dos lambaris do Rio Doce coletados no verão de 2019.



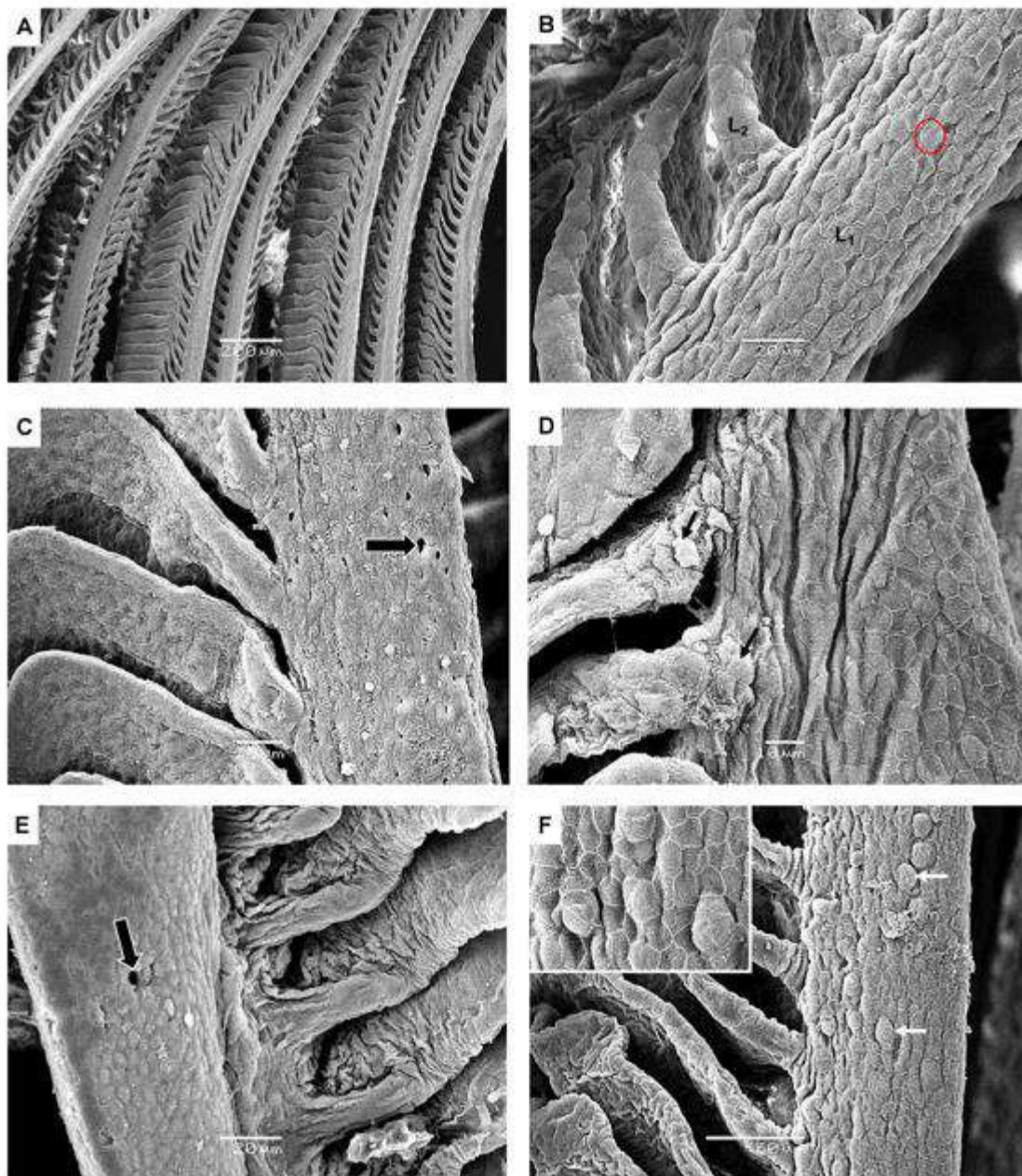
A – Extravasamento de eritrócitos na lamela primária (seta) possivelmente relacionado à um processo inflamatório. B - C – Descamação do epitélio branquial da lamela primária. D – Necrose das células pavimentosas (setas). E – Secreção de muco pelas células mucosas (ponta da seta) e alterações estruturais das lamelas. F – Parasita vermiforme

FIGURA 30. Micrografia das brânquias dos lambaris do Rio Doce coletados no verão de 2019 apresentando uma estrutura não identificada.



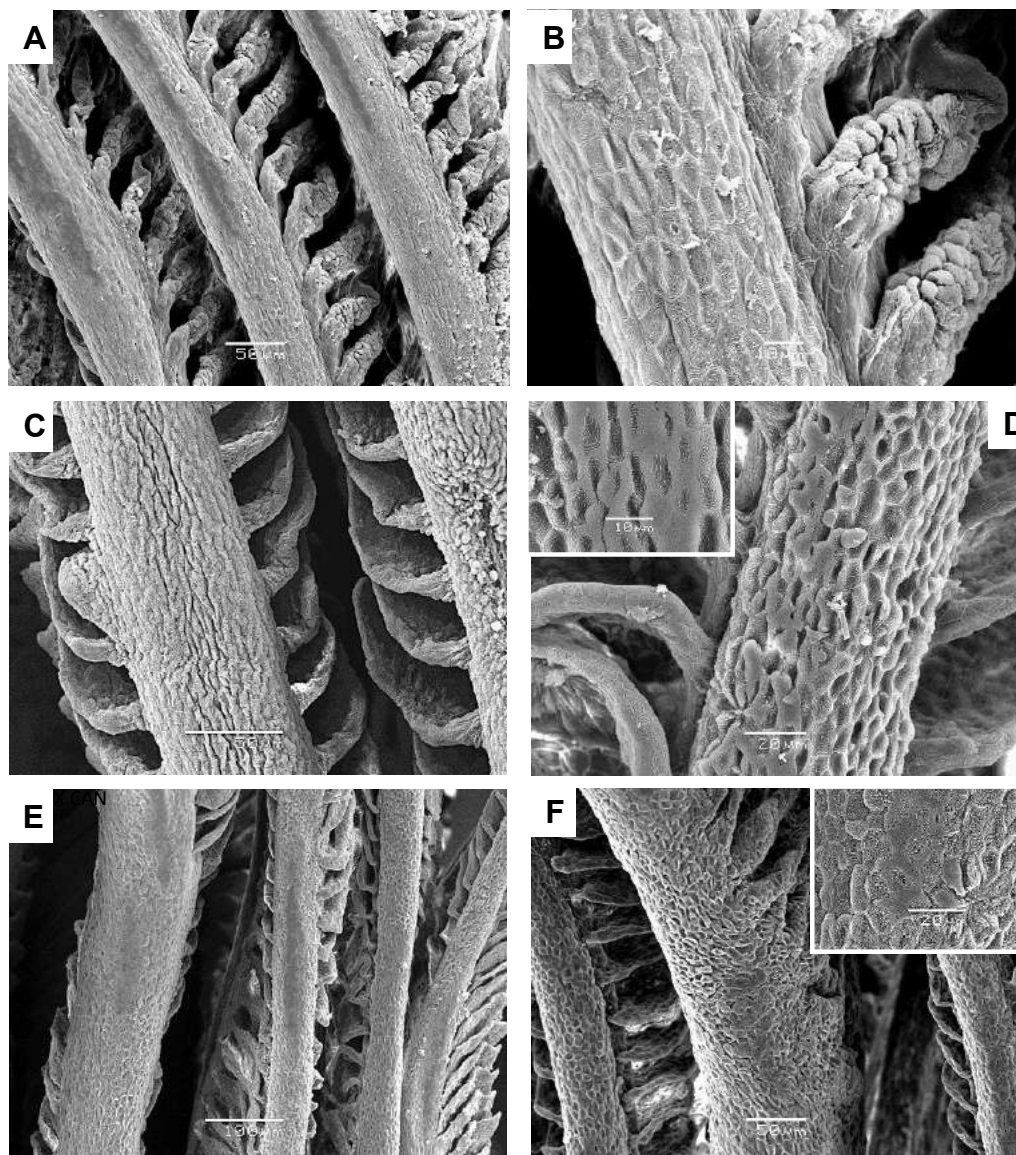
A estrutura de formato cônico-pontiaguda indicada pelas setas aparenta possuir papel químico-sensorial para as brânquias.

FIGURA 31. Micrografia das brânquias dos jundiás do Rio Doce coletados no verão de 2019.



A –Morfologia normal das brânquias de jundiá. B – Células pavimentosas delimitadas pelas microdigações (círculo vermelho). C e E – Orifícios irregulares das células de cloreto. D – Neoplasia das células pavimentosas das lamelas secundárias. F – Inchaço incomum das células pavimentosas.

FIGURA 32. Micrografia das brânquias dos mandis do Rio Doce coletados no verão de 2019.



A – F - Alterações nas microdigitações e estruturas das lamelas primárias e secundárias. C e F – Fusão lamelar e necrose na lamela primária (C). E e F – Hipertrofia e ausência de uniformidade na estrutura das lamelas primárias,

Portanto, a morfologia das brânquias pode fornecer muitas evidências das condições da saúde dos peixes, se mostrando como um bom biomarcador para a avaliação da poluição dos ambientes aquáticos (Salamat, et al., 2013; Strzyzewska et al., 2016).

Fígado e gônadas – Microscopia de Luz

A análise da histologia do fígado está em andamento, com mais da metade do material (lambaris e bagres do verão) pronto para análise (lâminas coradas, lambaris verão analisados); outra parte do material já cortado falta ser corado (lambaris inverno) e processado (bagres inverno), porém estas foram interrompidas devido às recomendações

de isolamento da pandemia do COVID-19. A previsão é de finalizar esta análise até o final de 2020.

As amostras das gônadas dos peixes, já emblocadas em paraplast, estão sendo processadas por uma aluna de doutorado com previsão para finalizar a análise até 2021.

Teste de Toxicidade com os Embriões de jundiá

As soluções de elutriato preparadas a partir das amostras de água e sedimento coletadas nos 8 pontos da Bacia do Rio Doce, no verão de 2020, apresentaram parâmetros físico-químicos semelhantes (TABELA 11), com exceção de REF, GOV e COL que apresentaram menores níveis de O₂ dissolvidos, mas ainda bem acima dos limites inferiores (3 mg.L⁻¹). Optou-se pela não aeração das amostras antes da exposição, uma vez que o fornecimento de O₂ para a solução poderia influenciar nas espécies químicas dos metais e outros compostos presentes na solução. Possivelmente estes níveis estejam relacionados com uma maior concentração da matéria orgânica do sedimento destes locais.

Tabela 11. - Parâmetros físico-químicos das soluções de elutriato do Rio Doce

	Dissolved O ₂ (mg/ml)	pH	OM sediment (%)
CONTROL		7,4	
GUA	7,8	7,25	5,24
CAN	6,3	7,28	5,21
NAQ	6,1	7,12	5,26
REF	4,4	7,09	6,25
GOV	4,5	7,17	5,46
AIM	6,1	7,22	5,60
COL	4,5	6,85	5,48
LIN	5,8	6,69	5,37

Taxa de sobrevivência dos embriões de jundiá

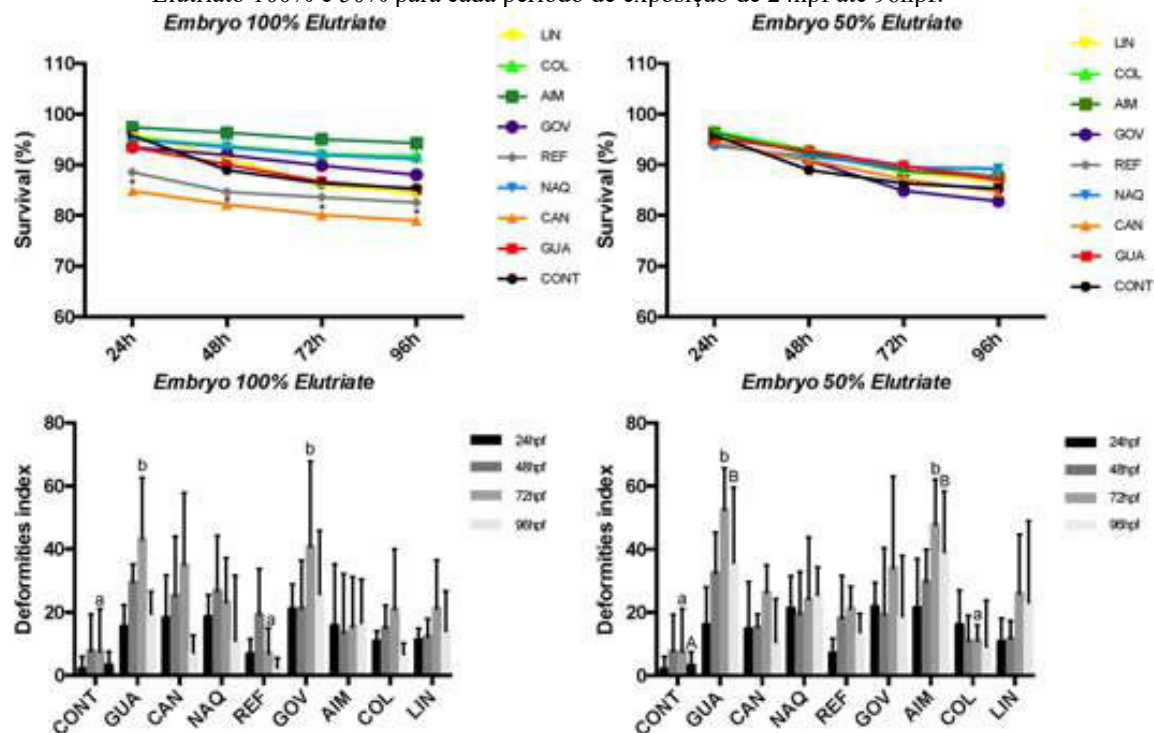
Após 88h de exposição (96hpf) às soluções de 100% elutriato do Rio Doce e à água reconstituída, para o controle negativo, não foram observadas diferenças significativas da taxa de sobrevivência entre o grupo controle e os demais tratamentos (TABELA 12, FIGURA 33). Apenas CAN teve uma taxa de sobrevivência menor que AIM e LIN, nas primeiras 24hpf, e até 96hpf se manteve menor que NAQ, AIM e COL. Para os embriões expostos ao elutriato 50%, não houve nenhuma diferença significativa para a taxa de sobrevivência. Em média, aproximadamente 87% ($\pm 4\%$) dos embriões

sobreviveram durante o experimento, o que viabiliza o teste pela elevada taxa de sobrevivência obtida, estando de acordo com a recomendada por outros estudos (OECD, 2013). A sensibilidade do organismo modelo foi confirmada através da exposição de 96 embriões à duas concentrações distintas de ZnCl_2 (100 mg/ml e 10 mg/ml). Na maior concentração de 100 mg/ml de ZnCl_2 , observou-se que apenas 2,08% dos embriões sobreviveram nas primeiras 16h de exposição (24hpf) e que apenas 5,2% sobreviveram até 40h (48hpf) de exposição à menor concentração de ZnCl_2 . Portanto, esta alta taxa de mortalidade valida o uso do organismo modelo utilizado no presente estudo, o qual demonstrou sensibilidade ao ZnCl_2 e que as soluções de elutriato do Rio Doce não apresentaram efeitos letais significativos, quando observados até 96hpf.

Tabela 12. Taxa de sobrevivência dos embriões controle e elutrios 100% e 50% de 96hpf.

	CONT	REF	GUA	CAN	NAQ	GOV	AIM	COL	LIN
100%	0.85	0.83	0.84	0.79 ^a	0.92 ^b	0.86	0.95 ^b	0.95 ^b	0.85
Elutriate	±0.03	±0.09	±0.05	±0.06	±0.02	±0.08	±0.02	±0.06	±0.06
50%	0.85	0.88	0.87	0.89	0.89	0.83	0.88	0.89	0.87
Elutriate	±0.03	±0.02	±0.11	±0.13	±0.06	±0.09	±0.06	±0.06	±0.05

FIGURA 33. Curva de sobrevivência e índices de deformidades dos embriões expostos ao Elutriato 100% e 50% para cada período de exposição de 24hpf até 96hpf.



Os dois gráficos superiores mostram a taxa de sobrevivência (%) ao longo das 96h de exposição, sendo cada linha representada por um grupo diferente (CONT, GUA, CAN, NAQ, REF, GOV, AIM, COL e LIN). Já os dois gráficos inferiores mostram os índices de deformidades totais observados para cada período de exposição (24, 48, 72 e 96h). GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

Taxa de Deformidades dos embriões de jundiá

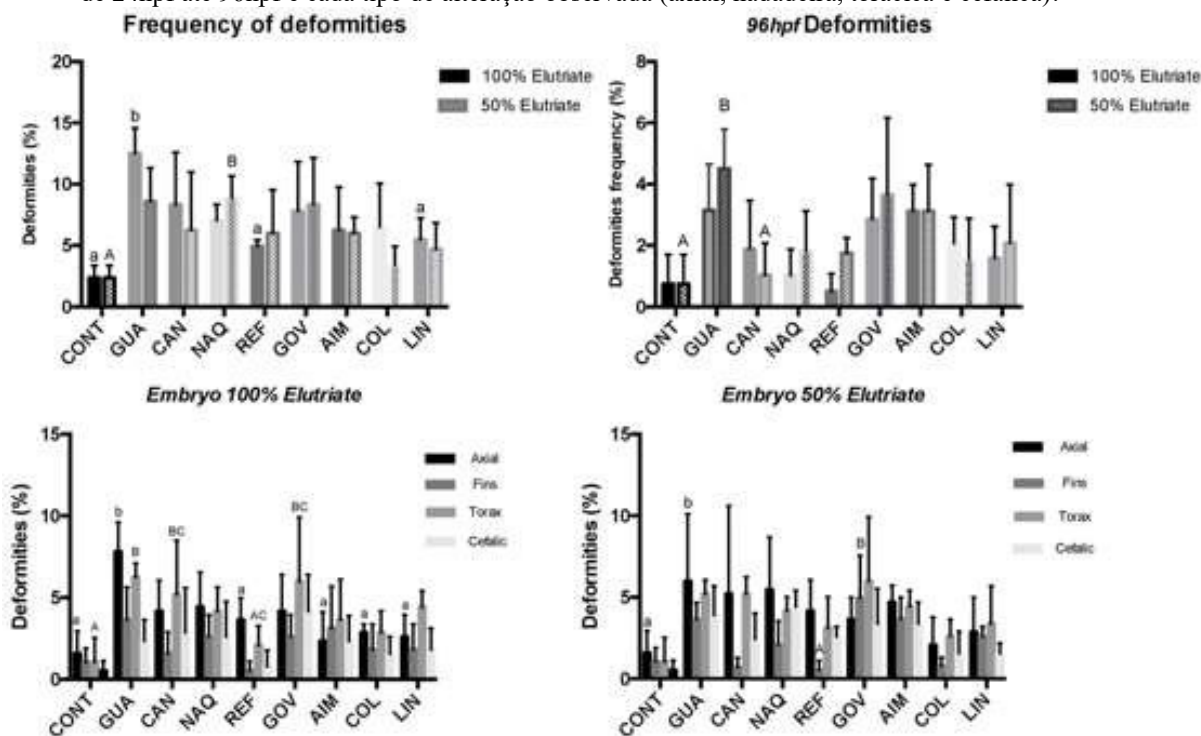
Por outro lado, os efeitos subletais observados através das taxas de deformidades (FIGURA 33 e 34), demonstraram efeitos diferenciados da taxa de sobrevivência. Durante as 88h de exposição, verificou-se que os embriões expostos ao elutriato 100% de GUA apresentaram maior frequência de deformidades totais (13,5% dos indivíduos) quando comparados ao grupo controle negativo (2,3%), ao REF (5%) e LIN (5,4%). O índice de Deformidades, que representa a soma de todas as alterações observadas para cada período de 24hpf, mostrou que os embriões de 72hpf são os que se apresentaram os valores mais elevados, sendo GUA (i=43) e GOV (i=40,7) maiores que CONT (i=7,5) e REF (i=7).

Quando os embriões foram expostos ao elutriato diluído à 50% em água reconstituída, a diferença da frequência de deformidades (até 96hpf) entre GUA (8,6%) e CONT (2,3%) não foi mais estatisticamente significativa. Ao mesmo tempo, a diluição também não foi responsável por diminuir a frequência de deformidades quando comparada ao elutriato 100%. Para os embriões de NAQ expostos ao elutriato diluído à 50% (8,8%), observa-se uma frequência ainda maior de deformidades do que o grupo NAQ 100%, sendo significativa quando comparado ao grupo CONT. Com relação ao índice de deformidades, verifica-se que os embriões de GUA e AIM (50%) de 72hpf e 96hpf apresentam maiores índices em relação ao CONT.

Ao comparar a ocorrência dos 4 tipos de deformidades morfológicas, observou-se que as alterações axiais (lordose e cifose) foram as mais frequentes (FIGURA 34 e 35), principalmente em embriões do elutriato 100% de GUA (7,8%), e menos frequentes em CONT (1,6%), REF (3,6%), AIM (2,3%), COL (2,8%) e LIN (2,6%). A segunda deformidade mais frequente foi a torácica (edema cardíaco e do saco vitelínico), sendo maior nos embriões de GUA, CAN e GOV, quando comparados ao CONT, sendo apenas GUA significativamente maior que REF. Nos embriões expostos ao elutriato diluído à 50%, observa-se que se mantêm um mesmo padrão da frequência de cada tipo de deformidade, com GUA e GOV maiores que REF. As alterações na estrutura das nadadeiras foram menos frequentes que as axiais e torácicas, porém nos embriões de GOV (50% elutriato), estas foram mais frequentes que em REF. Por fim, as alterações

cefálicas foram as menos frequentes das quatro, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos. Porém alguns indivíduos apresentaram alterações severas, como a ausência da formação dos barbilhões, e dos olhos, o que seguramente compromete o desenvolvimento e sobrevivência do organismo até as fases mais adultas (FIGURA 35).

FIGURA 34. Frequência de deformidades totais dos embriões expostos ao Elutriato 100% e 50% de 24hpf até 96hpf e cada tipo de alteração observada (axial, nadadeira, torácica e cefálica).

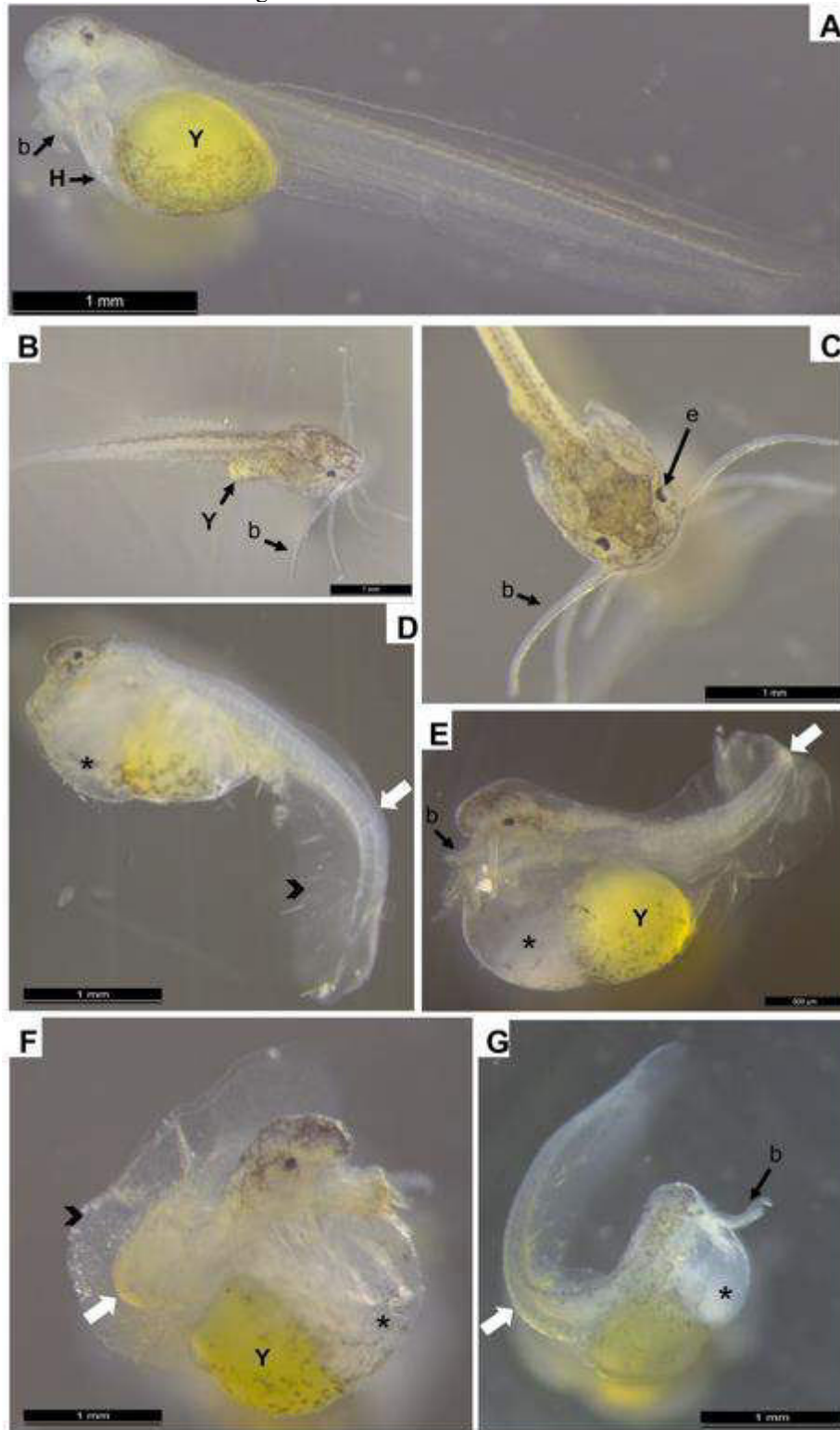


Os dois gráficos superiores mostram a frequência de deformidades (%), primeiramente considerando todos os indivíduos que apresentaram alterações desde 24 a 96h, e ao lado os que permaneceram vivos até as 96h com algum tipo de alteração. Os dois gráficos abaixo mostram a frequência de indivíduos que apresentou cada tipo de deformidade (axial, nadadeiras, torácica e cefálica) até as 96h.

GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

Alguns embriões de 96hpf dos grupos de elutriatos, que apresentaram corpo atrofiado e edema cardíaco e do saco vitelínico, demonstraram morfologia “semelhante” a um embrião de 48hpf, o que indica um atraso no desenvolvimento. De fato, o edema do saco vitelínico sugere uma deficiência na absorção dos nutrientes presentes neste órgão, interferindo no metabolismo energético essencial para o desenvolvimento adequado do organismo.

FIGURA 35. Morfologia dos embriões controles e Elutriato 100% e 50% de 48 e 96hpf.



Embriões de jundiá de 48 hpf e 96 hpf. A – Embriões de 48hpf do grupo controle negativo (larva inicial) sem alterações. B, C – Embrião 96 hpf controle negativo (pós-larva), com desenvolvimento embrionário normal. Os barbilhões estão bem desenvolvidos (b), olhos (e) e bocas definidos, o saco vitelínico (Y) é bem reduzido. D – Embrião de 96 hpf de GUA com edema cardíaco (*), deformidade facial, ausência de barbilhões, deformidades axiais (seta branca) e nas nadadeiras (ponta da seta). E, F – Embrião de 96hpf de AIM, com edema cardíaco e saco vitelínico grande, barbilhões e nadadeiras com morfologia alterada. G – Deformidade facial com ausência de olhos e alteração axial. O atraso no desenvolvimento de embriões de 96 hpf (D- G) é evidenciado pelo maior tamanho do saco vitelínico, atrofia do corpo e morfologia similar ao embrião de 48hpf.

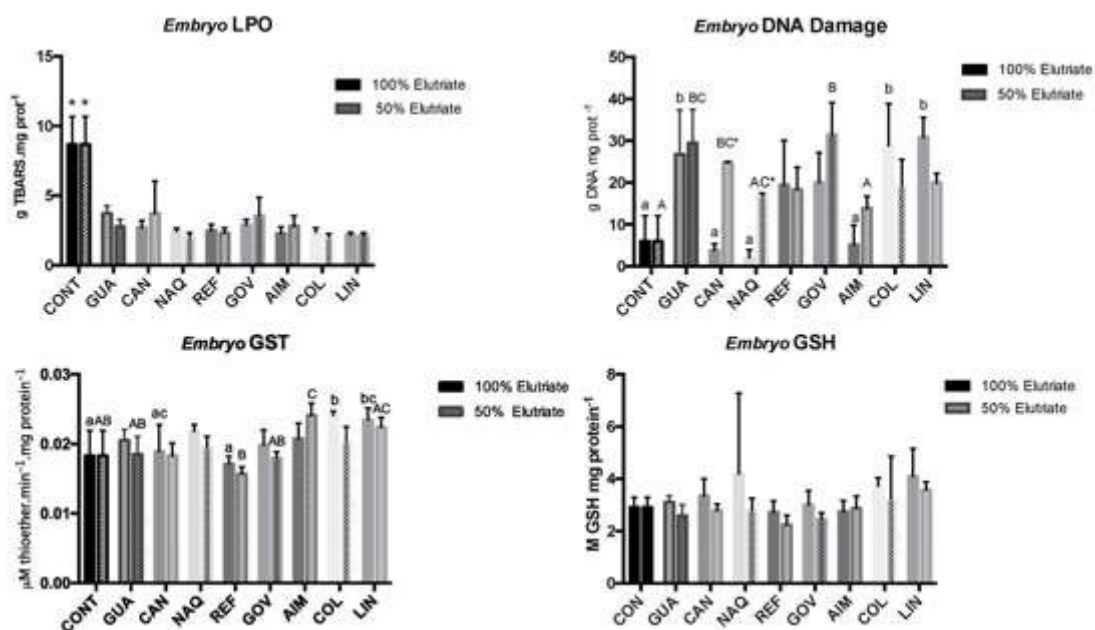
Grande parte destas alterações morfológicas observadas podem ser críticas para o crescimento e sobrevivência destes organismos até a fase adulta. Além disso, ainda se faz necessário o desenvolvimento adequado do sistema reprodutor para o sucesso reprodutivo da espécie, e consequente manutenção dos níveis populacionais em um ecossistema. Estes resultados demonstram que ao considerar apenas os efeitos letais do elutriato, como a taxa de sobrevivência dos embriões, pode haver uma subestimação da toxicidade das amostras de água e sedimento do Rio Doce. Pois ao considerar os efeitos sub-letais, como as deformidades, observou-se que os embriões expostos ao elutriato, principalmente de GUA e GOV, apresentaram efeitos adversos significativos quando comparados ao grupo controle. Mesmo com uma diluição do elutriato à 50%, verificou-se que estes efeitos ainda permanecem ocorrendo para a maioria dos indivíduos.

Análises bioquímicas

As amostras dos pools de embriões homogeneizados mostraram maiores níveis de peroxidação lipídica nos controles (água reconstituída), quando comparados aos elutrios, tanto as soluções de 100% como as de 50% (FIGURA 35). A análise bioquímica que demonstrou resultados mais significativos foram os Danos no DNA. Os embriões de GUA apresentaram maiores níveis de DNA fragmentado, quando comparados ao CONT, tanto para os elutrios 100% como para os de 50%. Nos embriões de COL e LIN 100% elutriato, também houve maiores níveis de dano em relação ao CONT, CAN, NAQ e AIM. Já para o elutriato de 50%, apenas CAN e GOV, além de GUA, apresentaram maiores danos nesta macromolécula.

Com relação aos antioxidantes, verificou-se que a atividade da GST nos embriões foi maior nos embriões de AIM 50% elutriato e COL e LIN 100% elutriato, quando comparados ao CONT e REF. Os níveis de GSH não diferiram significativamente entre os grupos.

FIGURA 35. Biomarcadores bioquímicos (LPO, Dano no DNA, GST e GSH) dos embriões expostos ao Elutriato 100% e 50% por 96hpf.



GUA – Gualaxo do Norte. CAN – Candonga. NAQ – Naque. REF – Rio Corrente (Referência). GOV – Governador Valadares. AIM – Aimorés. COL – Colatina. LIN – Linhares. Letras indicam diferenças significativas entre locais de uma mesma estação (a,b). * Indica diferenças sazonais para um mesmo local.

O teste de toxicidade com os embriões de jundiá representou um ensaio efetivo para a avaliação da toxicidade dos poluentes presentes no sedimento e água do Rio Doce, sendo o primeiro a ser realizado com as amostras do Rio Doce. Apesar de não ter sido verificada mortalidade significativa dos embriões, foi possível detectar efeitos subletais significativos após exposição ao elutriato, demonstrando uma sensibilidade intermediária do organismo modelo, adequada para estudos de toxicidade. Ficou claro no presente estudo que ao considerar apenas as taxas de mortalidade dos embriões, a toxicidade dos contaminantes do Rio Doce pode ser subestimada, uma vez que os dados dos efeitos subletais demonstraram resultados significativos.

De fato, estes testes de toxicidade com embriões de peixes tem sido cada vez mais adotados pela comunidade científica, não somente pela questão ética do sacrifício dos organismos adultos, mas também pela maior sensibilidade que apresentam nas respostas frente aos contaminantes ambientais (Embry et al., 2010; OECD, 2013; Zhu et al., 2015). Uma das espécies globalmente mais estudadas nestes ensaios é o *zebrafish* ou paulistinha (*Danio rerio*), a qual apresenta o genoma todo sequenciado, uma sensibilidade adequada

e fácil manutenção de cultivo e de reprodução (Yilmaz et al., 2018). Porém, o uso de espécies nativas é mais recomendado para estudos de biomonitoramento, uma vez que podem refletir de forma mais realística o cenário de exposição de um determinado ambiente. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de ampla distribuição geográfica na América Latina e nativa da Bacia do Rio Doce, e apesar da sua distribuição mais restrita à região do Alto Rio Doce, ele demonstra ser um bom modelo animal para estudos ecotoxicológicos, especialmente em testes durante seu desenvolvimento embrionário (Barrera, 2013; Brito et al., 2017; Brito et al., 2018; Folle, 2018). É uma espécie bem estudada tanto na aquicultura, como na ecotoxicologia, com o desenvolvimento embrionário bem descrito, e de fácil adaptação em cativeiro e indução artificial da reprodução (Gomes et al., 2000; Moura Costa et al., 2016; Rodrigues-Galdino et al., 2010). Considerando seu grande porte e fisiologia reprodutiva, as fêmeas induzidas com extrato hipofisário contendo GnRH, podem desovar uma grande quantidade de gametas (muito superior que a do *zebrafish*, por exemplo), gerando milhões de ovos fertilizados com a mistura do esperma de um único macho. Além de apresentar uma sensibilidade adequada para muitos estudos de ecotoxicologia, esta espécie se demonstra eficiente para a avaliação da toxicidade dos sedimentos, uma vez que vive em contato com este compartimento onde se deposita a maior parte dos compostos no ambiente aquático.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente estudo, mesmo que preliminares, foram capazes de demonstrar os potenciais efeitos adversos na saúde dos peixes da Bacia do Rio Doce, provavelmente relacionados à presença dos poluentes neste ambiente. Através das informações disponíveis na literatura é possível concluir que elevadas concentrações de metais, principalmente de ferro e manganês detectados na água e sedimento, foram mobilizados ao longo da bacia do Rio Doce após o rompimento da barragem do Fundão, em 2015, modificando as características geoquímicas da bacia. Adicionalmente, elementos tóxicos não essenciais, como o arsênio, mercúrio, chumbo e cádmio, mesmo que presentes em menores concentrações, apresentam risco à biota e apontam evidências do quadro de contaminação crônica pré-existente do Rio Doce. Passados mais de 3 anos do evento, os níveis diminuíram significativamente, mas ainda ultrapassam os limites legais em alguns casos, especialmente em épocas chuvosas e nas localidades mais próximas da nascente do rio, no Alto Rio Doce. Os estudos mostram um gradiente de contaminação de metais ao longo do percurso do Rio Doce, onde as concentrações são mais baixas próximo à sua foz, no Baixo Rio Doce. Porém, ainda falta investigar a ocorrência dos poluentes orgânicos ao longo da bacia, uma vez que estes, assim com os metais, podem desencadear efeitos adversos nos organismos.

De acordo com as análises dos biomarcadores, os peixes de GUA foram os que apresentaram as maiores respostas de toxicidade: maiores níveis de LPO, menores níveis de antioxidantes (GSH e GST), evidenciando um quadro de estresse oxidativo, alterações morfológicas nucleares nos eritrócitos e nas brânquias, assim como maiores taxas de deformidades nos embriões expostos ao elutriato (TABELA 15). É provável que estas respostas estejam associadas aos elevados níveis de metais presente neste ambiente. Por outro lado, os peixes de GOV e do baixo Rio Doce também apresentaram alterações significativas que indicaram que também estão sujeitos à exposição de contaminantes presentes nestas regiões. Nos peixes de GOV foram observados danos no DNA, assim como a expressão da vitelogenina em peixes machos, e deformidades nos embriões o que indica uma exposição à contaminantes genotóxicos, desreguladores endócrinos e teratogênicos, respectivamente. Enquanto, a maior atividade da AChE nos peixes do baixo Rio Doce, pode representar uma resposta de indução da apoptose pela exposição a outros contaminantes na região. Portanto, não necessariamente existe uma melhora na

qualidade da água ao longo do percurso do rio, uma vez que outras fontes de poluição pontuais e difusas ocorrem no Rio Doce, como os efluentes domésticos sem tratamento, as atividades industriais e agrícolas que introduzem também contaminantes orgânicos além dos metais. Estes efeitos ficaram mais evidentes nos peixes de GOV, onde foram observadas mais respostas que corroboraram com esta hipótese, sendo necessária a conclusão das outras análises para uma confirmação destes resultados.

O teste de toxicidade com os embriões de peixes mostrou ser um ensaio efetivo para avaliar os efeitos toxicológicos do compartimento sedimento do Rio Doce, principalmente quando os endpoints de toxicidade crônica (subletais) são analisados. A exposição aos elutriados do Rio Doce, especialmente dos locais mais próximos do rompimento da barragem do Fundão (GUA), causou maiores deformidades e dano no DNA em uma espécie nativa de peixes, durante os estágios iniciais do desenvolvimento, o que pode comprometer a sobrevivência à longo prazo e o sucesso reprodutivo. A taxa de sobrevivência por si só não demonstrou ser um parâmetro adequado para avaliar a toxicidade dos poluentes presentes no Rio Doce, uma vez que pode subestimar o potencial de toxicidade do sedimento aos organismos nativos e reforça a importância dos efeitos subletais nos organismos.

Com a conclusão da análise de todos os dados deste estudo e a integração dos dados através da estatística multivariada, será possível fornecer um diagnóstico mais completo da qualidade ambiental da Bacia do Rio Doce, servindo de suporte para tomadas de decisões por parte das autoridades públicas, em função do bem estar da comunidade e do meio ambiente como um todo.

ATIVIDADES REFERENTES AO RELATÓRIO PARCIAL II (01/06/2020 a 01/06/2021)

Análises incluídas ao longo do desenvolvimento do projeto

1. Experimento da indução da expressão da vitelogenina de *Pimelodus maculatus*

Inicialmente foram realizados vários testes de afinidade e especificidade entre os anticorpos disponíveis no Laboratório de Toxicologia Celular e as amostras de plasma de mandi contendo vitelogenina, para verificar qual anticorpo apresentaria melhor eficácia para a detecção da vtg. Através da técnica de Western blotting verificou-se uma reação aparentemente mais específica com o anticorpo anti-vtg de cará (*Geophagus brasiliensis*, Yamamoto et al., 2018) e observaram-se reações positivas com amostras de peixes machos do Rio Doce, conforme descrito no último relatório científico (Figura 1).

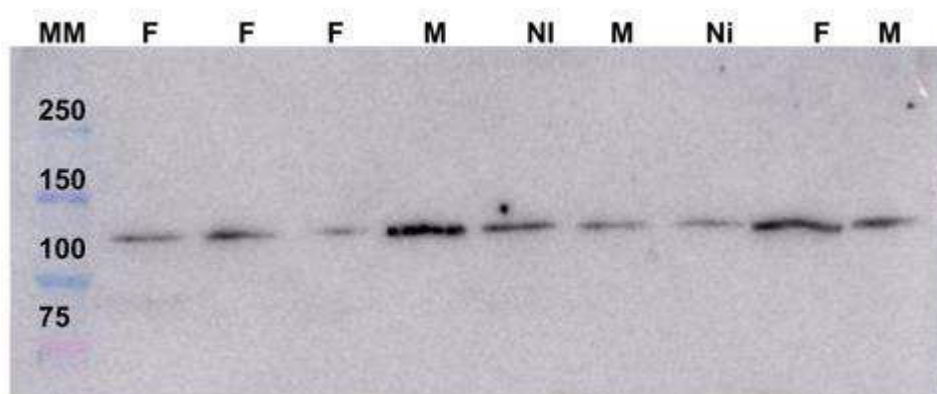


Figura 1. Detecção da expressão da vitelogenina no plasma de mandis machos (M) e fêmeas (F) coletados no Rio Doce, através da técnica de Western blotting, com anticorpo anti-vtg de cará. NI = sexo não identificado.

Para confirmar a especificidade da reação (ou seja, se o anticorpo estava se ligando à vtg e não a outra proteína) e assim evitar resultados falsos positivos, foi realizado um experimento de indução da expressão da vtg em mandis, para obtenção de amostras de controles positivos (amostra contendo a vtg) e negativos (amostra não contendo a vtg). A vitelogenina (vtg), é uma lipo-fosfo-glicoproteína de elevado peso molecular, produzida por fêmeas ovíparas em época reprodutiva (SPECKER, 1994). Sua síntese é induzida pela presença do hormônio estradiol, o qual se liga aos receptores estrogênicos intracelulares dos hepatócitos e sinalizam sua expressão (Hiramatsu et al., 2015). Em peixes machos, os quais apresentam baixos níveis de hormônios estrogênicos circulantes, sua síntese também pode ser induzida através da exposição à substâncias estrogênicas (Matozzo, 2008).

Neste experimento, peixes machos obtidos na piscicultura Panamá (Paulo Lopes, SC) receberam uma injeção intraperitoneal com uma solução de etinilestradiol (10 mg.kg⁻¹) para expressão da vitelogenina (controles positivos). Simultaneamente também foram obtidos controles negativos (machos que não foram induzidos com EE2). Através da coloração Coomassie blue do gel de poliacrilamida foi possível visualizar a presença da vitelogenina em amostras de peixes machos induzidos (Figura 2).

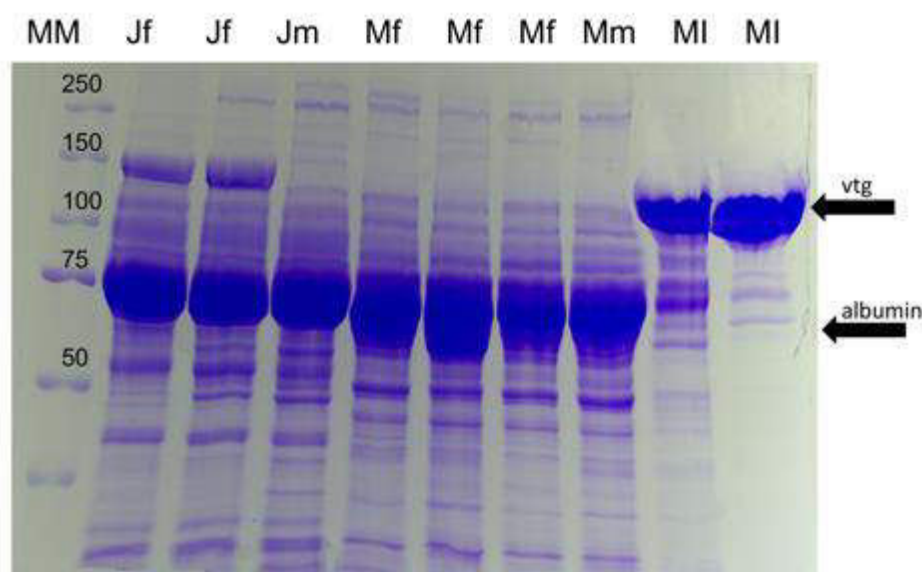


Figura 2. Gel de poliacrilamida com coloração Coomassie blue para visualização das bandas características do plasma dos peixes jundiás e mandis e o conteúdo de vitelogenina em diferentes amostras. Observa-se maior concentração de vitelogenina em amostras de fêmeas de jundiá (Jf) e em mandis machos induzidos (MI), enquanto em mandis fêmeas (Mf) e machos (Mm) sua concentração parece baixa. A vitelogenina de mandi aparece como uma proteína de alto peso molecular exibindo uma banda de aproximadamente 120 kDa. Nota-se a elevada concentração de albumina plasmática nas amostras dos peixes do Rio Doce, enquanto nos peixes induzidos a vitelogenina é a proteína predominante.

Metodologia para a Indução da expressão da vitelogenina

A expressão da vitelogenina de *P. maculatus* foi induzida para a obtenção de amostras de controle positivo e para ser utilizada na curva padrão de ELISA de acordo com Costa et al., (2010) e Yamamoto et al., (2017). Para tanto, dez peixes adultos machos de *P. maculatus* foram obtidos na Piscicultura do Panamá (Paulo Lopes, Brasil) e foram transportados para o laboratório, onde permaneceram por um período de aclimação de 7 dias em tanques de 150 L (5 peixes por tanque) com troca de água a cada 3 dias. Os peixes foram alimentados a cada 3 dias com ração comercial antes da troca de água. Para a indução da expressão da vitelogenina, uma solução de 10 mg.ml⁻¹ de 17 α -etinilestradiol (EE, Sigma) foi preparada em óleo de girassol extra virgem (Phytoterapica) e cinco peixes

machos receberam injeção peritoneal de 10 mg EE.kg⁻¹ de peixe (Figura 3). Após 8 dias, os peixes foram anestesiados com benzocaína 0,02%, pesados e o sangue coletado da veia caudal com seringa heparinizada. Para a análise de vitelogenina, o plasma foi obtido após centrifugação a 4000 g por 2 min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi aliquotado em tubos contendo 100 mM de solução PMSF antiproteolítica (final 1-10 mM; Sigma Aldrich) e armazenado em nitrogênio líquido a -75° C. Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados com secção vertebral.



Figura 3. Peixes machos de *P. maculatus* recebendo injeção intraperitoneal de solução de etinilestradiol, sendo mantidos por 8 dias em tanques de 150L na UFPR.

2. Padronização do Ensaio de ELISA e Purificação da vitelogenina de mandi para curva padrão

Para ensaios de ELISA quantitativo é recomendado que seja utilizada, para a curva padrão a vitelogenina da mesma espécie, purificada e quantificada, que a da amostra a ser testada para ser utilizada no cálculo das concentrações, onde a afinidade entre o anticorpo e a vtg da curva seja equivalente a da vtg da amostra. Sendo assim, foi realizada a purificação da vtg de mandi através da cromatografia líquida, resultando em um elevado grau de pureza da vtg (Figura 4) para ser utilizada na curva padrão do ELISA e com potencial a ser utilizada para produção de anticorpos policlonais em estudos futuros.

Metodologia para a Purificação da vitelogenina

Amostras de peixes machos induzidos a expressar vitelogenina foram utilizadas para a purificação da vitelogenina de *Pimelodus maculatus* por um sistema de cromatografia líquida automatizado (AKTATM go) no Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR. Primeiramente, as amostras contendo alta concentração de vitelogenina foram diluídas em tampão 1: 5 contendo Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, PMSF 0,5 mM, glicerol a 30%, pH 8,0 e a coluna foi equilibrada com tampão de amostra. Um volume total de 50 ml de amostra diluída foi injetada no sistema de cromatografia com um tampão ligante. Moléculas não ligadas foram lavadas com tampão de lavagem. A separação da vitelogenina foi realizada através de um gradiente salino em coluna de troca aniônica (Ge HiTrap HP Q 1ml), em um fluxo de 1 ml/min, apresentando um pico em 67% de tampão de eluição (600 mM NaCl, 50 mM Tris HCl), monitorado a 280 nm pelo Detector UV / VIS. As amostras eluídas coletadas através um coletor de frações e contendo as maiores concentrações de vitelogenina, de acordo com o cromatograma, foram reunidas e injetadas novamente no sistema de cromatografia através do mesmo procedimento, para aumentar a pureza da proteína. A alta eficiência da purificação da vitelogenina foi confirmada por SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie, conforme a Figura 4.

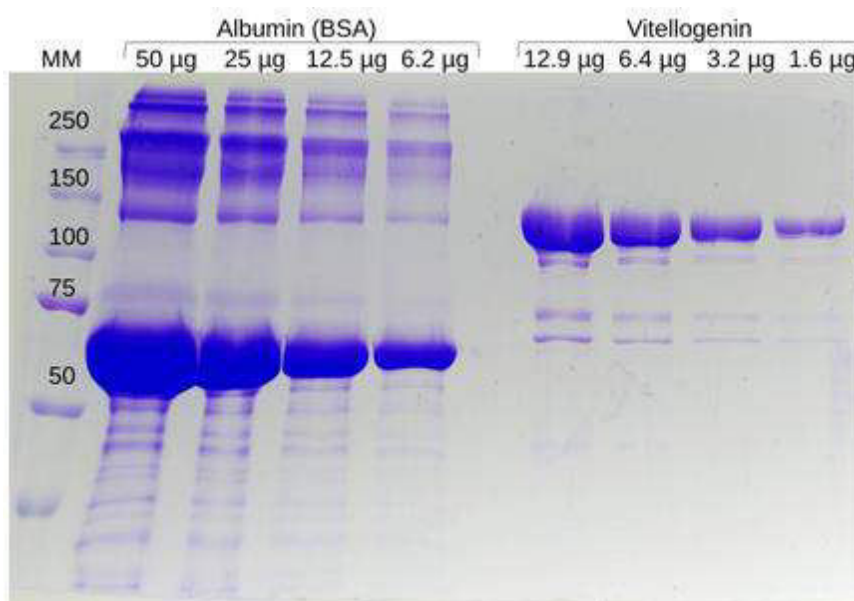


Figura 4. Curva padrão de albumina para quantificação da vitelogenina purificada de mandi. Observa-se o grau satisfatório de pureza da vitelogenina purificada do plasma de mandi macho induzido, a qual apresenta maior pureza que o padrão de albumina do soro bovina (Sigma aldrich, >96%).

Além da obtenção da proteína purificada, idealmente é importante apresentar amostras de controles positivo (fêmea expressando vtg) e negativo (macho não expressando vtg) para validação da detecção, evitando falsos negativos e falsos positivos, respectivamente (conforme realizado no experimento da indução da vtg). Além disso, para a grande maioria das espécies nativas brasileiras, não existem dados na literatura sobre a caracterização prévia da proteína a ser estudada, o que configura em uma maior incerteza na detecção da molécula. Por fim, as técnicas moleculares demandam maior mão-de-obra especializada, com maior conhecimento das técnicas empregadas, além do maior custo dos reagentes utilizados, o que limita a sua utilização em estudos de biomonitoramento e na área da ecotoxicologia, especialmente em países sob desenvolvimento, como o Brasil.

Por ser uma proteína precursora das proteínas do vitelo, a vitelogenina apresenta grande instabilidade em solução e pode sofrer clivagem na técnica desnaturante SDS-PAGE e apresentar diferentes fragmentos, cujos tamanhos podem variar entre diferentes espécies, o que dificulta sua caracterização e detecção. Estas condições podem ocorrer mesmo tomando os devidos cuidados para evitar sua degradação, como a adição de soluções antiproteolíticas e o armazenamento em ultrafreezer com manipulação sob o gelo. Este fato pode ser corroborado com a baixa disponibilidade de vitelogeninas comerciais disponíveis para compra pelas indústrias bioquímicas.

De forma geral, os anticorpos mesmo sendo policlonais, apresentam uma especificidade espécie-específica, o que dificulta a detecção de proteínas das espécies nativas brasileiras, uma vez que a maioria delas não dispõem de anticorpos comerciais disponíveis (Moura Costa et al., 2016; Yamamoto et al., 2017). A especificidade de um anticorpo se refere à sua capacidade de reconhecer um epítipo específico, e quanto maior sua especificidade menor a chance de se obter reações cruzadas, a qual pode ser útil para identificar antígenos relacionados, porém desvantajosa no reconhecimento de antígenos não relacionados. Uma vez que a ligação depende da configuração precisa anticorpo-antígeno, uma pequena mudança na estrutura pode afetar na força da interação, ou seja, um anticorpo pode não se ligar a uma proteína na sua forma desnaturada. (Lipman et al., 2005). Esta questão pode ser fundamentada com a produção de vários anticorpos policlonais específicos para a detecção da vitelogenina de uma determinada espécie de peixe, como é encontrada na literatura (Luo, Zhou, & Jiang, 2011; Oğuz, Özdemir, Ünal, & Oğuz, 2019; Selcer & Verbanic, 2014; Wang et al., 2015). Para espécies nativas brasileiras, observa-se apenas a produção do anticorpo-anti vtg de cará (*Geophagus*

brasiliensis, Yamamoto et al., 2017) e de *Rhamdia quelen* (Moura Costa et al., 2016) relatados na literatura.

Sendo assim, o grupo de Toxicologia Celular da UFPR, o qual está colaborando com esta pesquisa, idealizou a produção de um anticorpo capaz de reconhecer a vitelogenina de diferentes espécies de peixes através de um projeto financiado pela Companhia de Energia Elétrica do Paraná (Copel). Esta estratégia incluiu o desenvolvimento de uma proteína recombinante de *E. coli* contendo uma região conservada da vtg de tilápia (*Oreochromis niloticus*)(Folle, 2018). Porém, como a vtg foi obtida de forma insolúvel e foi sintetizada por bactérias, a qual é um sistema que não fornece as modificações pós-traducionais (sendo que a vtg recebe vários processos de modificações, como pontes sulfeto, glicosilações, fosforilações, etc), sua detecção demandou vários testes de padronização. No momento a utilização deste anticorpo está otimizada apenas para a tilápia (*O. niloticus*), sendo necessário ajustar os protocolos para as demais espécies. Além do anticorpo produzido a partir da vitelogenina recombinante, o laboratório de Toxicologia dispõe de outros anticorpos produzidos a partir da vitelogenina de espécies nativas, porém na forma desnaturada (Moura Costa et al., 2016; Yamamoto et al., 2017).

Anticorpos disponíveis: anti-vtg recombinante produzido em *E. coli* com fragmento conservado da vtg de tilápia (*O. niloticus*, Cichlidae); anti-vtg de cará (*G. brasiliensis*, Cichlidae) produzido a partir da vtg purificada desnaturada; anti-vtg de jundiá (*R. quelen*) produzido a partir da vtg purificada desnaturada.

Ao contrário da técnica de Western Blotting, ao realizar o ensaio de ELISA com o anticorpo anti-vtg de cará, não foi obtida uma reação satisfatória da ligação antígeno-anticorpo (anti-cará), sendo obtidos valores de absorbância muito baixos que evidenciaram baixa afinidade do anticorpo pela forma nativa da vitelogenina de mandi. Ressalta-se que o Western blotting forneceu resultados diferentes do ELISA, pois nas duas técnicas são utilizadas formas distintas das proteínas, sendo na primeira na forma desnaturada e na segunda na forma nativa. Uma vez que o anticorpo anti-cará foi gerado com a proteína desnaturada, sua afinidade por proteína desnaturada é maior que a forma nativa, o que explica a reação na técnica de WB e ausência (ou baixa) de ligação no ELISA.

Sendo assim, para o ELISA houve a necessidade de testar novamente a eficácia dos 3 anticorpos e verificou-se maior reação para o anticorpo anti-jundiá, pela maior proximidade taxonômica da espécie com o mandi. Porém o anticorpo anti-jundiá,

provavelmente pela forma que foi produzido, apresentou certa inespecificidade, demonstrando algumas ligações inespecíficas (com outras proteínas, como a albumina, além da vitelogenina) através da técnica de WB (Figura 5). De qualquer forma a afinidade é maior pela vitelogenina que por outras proteínas, o que permite realizar a detecção.

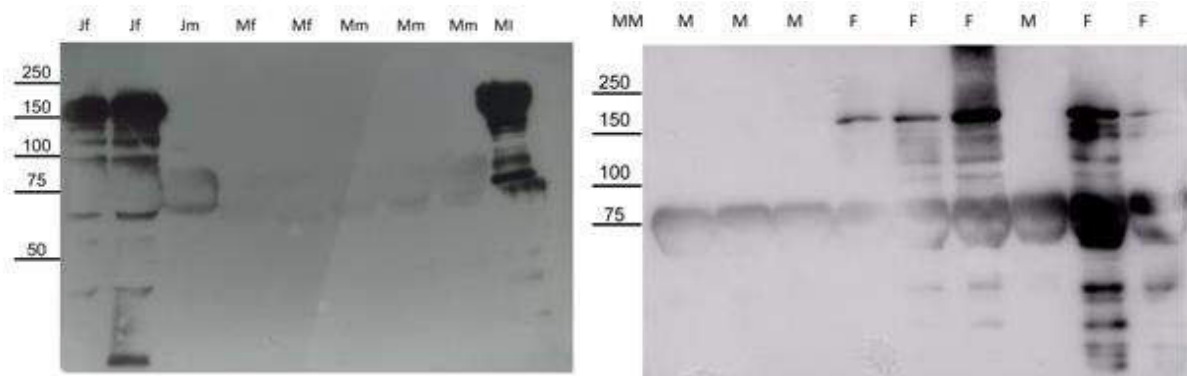


Figura 5. Detecção da expressão da vtg em plasma de jundiá e mandi através da técnica de WB, com anticorpo anti-vtg de jundiá. Observa-se a detecção da vtg em amostras de jundiás fêmeas (Jf; F), e Mandis induzidos (MI). Porém observa-se reações inespecíficas com a ligação do anticorpo à albumina plasmática, principalmente na figura da direita.

Sendo assim, uma tentativa para otimizar a detecção foi realizada com a extração da vtg através da precipitação por Cloreto de magnésio para aumentar sua concentração, e consequentemente reduzir a quantidade de albumina das amostras de plasma. Infelizmente a técnica não obteve resultados satisfatórios com perda significativa da vitelogenina (Figura 6).

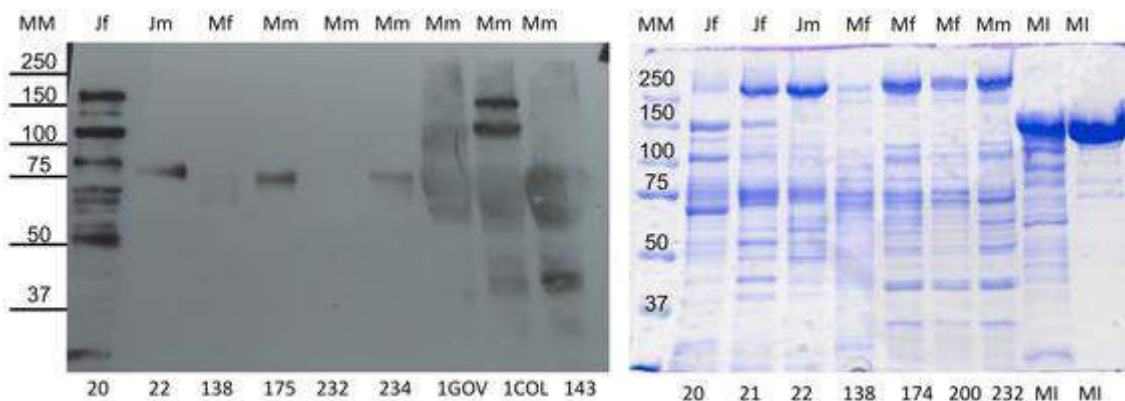


Figura 6. Tentativa de precipitação da vitelogeninca com cloreto de magnésio. Nota-se que não houve uma extração eficaz da vitelogenina, o que inviabiliza a técnica para ser utilizada na sua detecção.

Recentemente houve a biotinizilação do anticorpo anti-vtg recombinante e a padronização do ELISA sanduíche para a tilápia. O próximo passo é testar este protocolo para verificar se será possível obter um resultado mais satisfatório que o ELISA já

realizado com o anti-vtg de jundiá. De qualquer forma, com as amostras controles positivos e negativos já obtidas, além da vtg purificada para a curva padrão, a padronização do ELISA, a princípio, se encontra mais próxima da sua finalização.

*3. Teste de Toxicidade com embriões de *Rhamdia quelen* expostos às misturas de substâncias inorgânicas e orgânicas detectadas no Rio Doce*

Este experimento foi realizado em Março de 2021, para auxiliar na compreensão dos efeitos desencadeados pelos poluentes presentes no Rio Doce, diferenciando os efeitos dos metais e dos contaminantes orgânicos os quais apresentam distintas fontes de poluição. As amostras dos embriões expostos serão transportadas para o Instituto de Avaliação Ambiental e Pesquisa da água (IDAEA, Barcelona) para uma análise metabolômica que permitirá investigar mais especificamente as vias metabólicas desencadeadas por estes químicos ambientais. A princípio, estas análises farão parte do BEPE.

Materiais e Métodos

Grupos de tratamento

O delineamento experimental foi realizado para permitir a caracterização das respostas induzidas por metais, compostos químicos orgânicos e suas misturas, com base nas condições esperadas no rio Doce. Seis grupos de tratamento e dois grupos controles negativo e solvente foram usados para esta proposta (Figura 1): 1) duas misturas diferentes de metais (elementos essenciais e não essenciais), 2) duas misturas de produtos químicos orgânicos (obtidos de extratos de sedimentos do rio Doce) e 3) duas misturas diferentes, incluindo produtos químicos inorgânicos e orgânicos, 4) um controle negativo e um controle de solvente (acetona). O controle negativo assim como todas as soluções de tratamento foram preparadas com água reconstituída (CaCl_2 6,5 mg L⁻¹, MgSO_4 133,5 mg L⁻¹, KCl 0,4 mg L⁻¹ e NaHCO_3 10,5 mg L⁻¹ (ASTM, 1993) no laboratório de Toxicologia Celular da UFPR, onde foi realizado o ensaio de embriões de peixes (Figura).

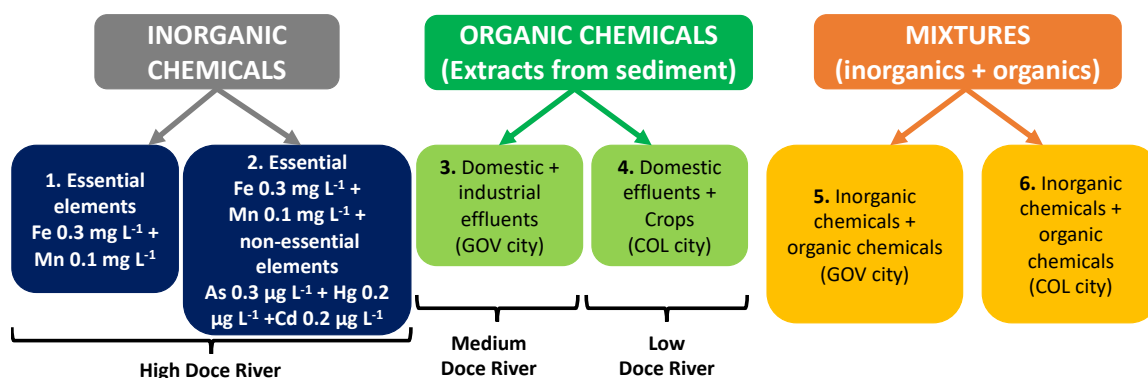


Figura. Grupos de tratamento para o FET de *Rhamdia quelen*, representando misturas de produtos químicos inorgânicos e orgânicos do Rio Doce.

As concentrações de produtos químicos inorgânicos usados para os grupos de tratamento (Fe 0,3 mg L⁻¹; Mn 0,1 mg L⁻¹; As 0,3 µg L⁻¹; Hg 0,2 µg L⁻¹; Cd 0,2 µg L⁻¹) foram determinadas de acordo com os resultados das análises químicas da água e dos sedimentos amostrados no rio Doce, e de estudos disponíveis na literatura. Os compostos orgânicos dos grupos de tratamento 3 e 4 foram extraídos, segundo o método de Cavalcante et al., (2007), a partir de amostras de sedimento liofilizado (do rio Doce, amostrado em 2019). Resumidamente, para cada de 15 g de sedimento, 25 ml de cada solvente, acetona, acetato de etila, diclorometano e hexano, e uma mistura dos quatro solventes na mesma proporção foram adicionados, permanecendo em sonificador por 20 min para cada solvente. Após ser sonicada, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min e subsequentemente concentrada em um evaporador rotativo até um volume final de 1 ml de acetona. Os extratos orgânicos e padrões de elementos traços (AccuStandard®, reagentes padrão de grau analítico) foram diluídos em água reconstituída de acordo com cálculos considerando suas concentrações originais no meio ambiente. Finalmente, os grupos 5 e 6 refletem as misturas químicas contendo metais e produtos químicos orgânicos presentes ao longo do rio Doce.

Ensaio de toxicidade embrionária

Os testes de toxicidade aguda com embriões de peixe de *Rhamdia quelen* foram realizados de acordo com as diretrizes da OECD (Teste 236, 2013), modificado de acordo com Andrade Brito et al (2018). Os bioensaios foram realizados no Brasil, antes da visita ao IDAEA (Barcelona). Embriões de peixes foram obtidos induzindo peixes machos e

fêmeas adultos à reprodução na Piscicultura Panamá (Paulo Lopes, Brasil) em Março de 2021. Peixes adultos fêmeas receberam 2 inoculações de extrato de hipófise de carpa ($5,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peixe), com intervalo de 12h. As doses foram calculadas de acordo com a massa de cada indivíduo e o momento de desova foi determinado de acordo com a temperatura ambiente para o somatório de graus-hora ($^{\circ}\text{C.h}$, Graeff et al., 2008; Val et al., 2005). Na indução da desova, o abdômen foi pressionado para liberação dos gametas, os quais foram misturados ao espermatozoide masculino em meio seco para fertilização, seguido da adição de água em temperatura ambiente. O transporte dos ovos foi realizado em sacos plásticos preenchidos com gás oxigênio até o laboratório de Toxicologia Celular (Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil) No laboratório, as soluções de cada grupo de tratamento foram adicionadas em microplacas de 96 poços ($200 \mu\text{L}$ por poço) para análise de sobrevivência e taxas de deformidades, e em béqueres de vidro de 250 ml (200 ml por béquer para análise metabolômica). Um grupo de controle negativo foi preparado usando água reconstituída ($6,5 \text{ mg}$ de $\text{CaCl}_2\cdot\text{L-1}$; $133,5 \text{ mg}$ de $\text{MgSO}_4\cdot\text{L-1}$; $0,4 \text{ mg}$ de $\text{KCl}\cdot\text{L-1}$; $10,5 \text{ mg}$ $\text{NaHCO}_3\cdot\text{L-1}$, ASTM, 1993), e um grupo de controle de solvente (acetum $0,005\%$) foram preparados para comparar com os grupos de tratamento. Embriões viáveis no estágio de gástrula (8hpf) foram selecionados e adicionados às microplacas e béqueres contendo as soluções adicionadas anteriormente (um embrião por poço / cada grupo de tratamento por linha na mesma microplaca, $n = 8$ para taxa de sobrevivência; 120 embriões por copo / 5 béqueres para cada grupo de tratamento, $n = 5$ para metabolômica, Figura 2 e 3) e foram expostos a 96hpf em um incubatório sob fotoperíodo controlado (12h luz / 12h escuro) e temperatura (24°C). A cada 24h a água ou solução era trocada parcialmente ($100 \mu\text{L}$ por poço; 100 ml por béquer), por meio de micropipeta, em sistema semiestático de exposição, e a letalidade verificada de acordo com a observação de: i) ovos coagulados; ii) falta de formação de somito; iii) não desprendimento da cauda; iv) falta de batimento cardíaco. Após esse período de 96hpf, os embriões foram anestesiados a -20°C e agrupados em um microtubo de 2 mL (um béquer cheio para cada microtubo, contendo aproximadamente de 50 a 100 embriões) e armazenados a -80°C para análises posteriores. As amostras serão liofilizadas e transportadas para o Instituto de Avaliação Ambiental e Pesquisa Hídrica (Barcelona, Espanha) para análise metabolômica.

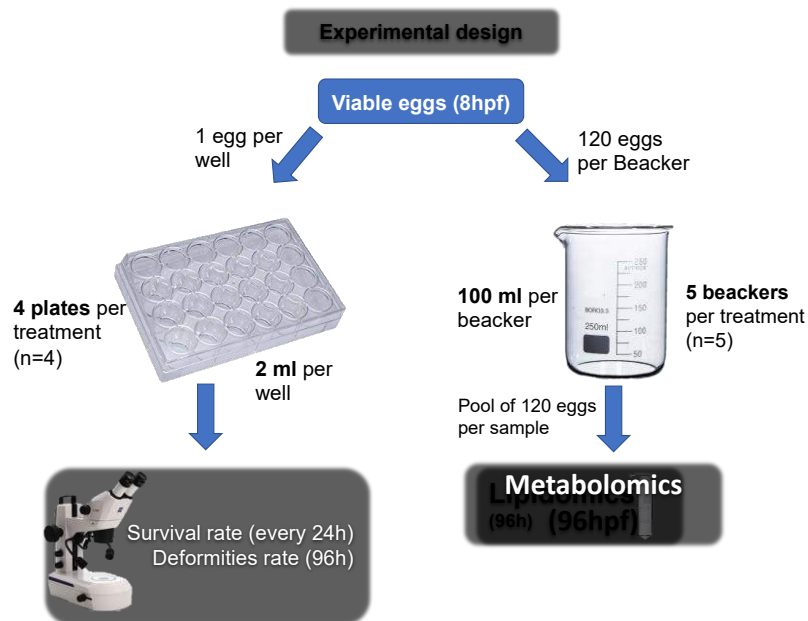


Figura 2. Desenho experimental do teste de toxicidade de embriões de peixes para taxas de sobrevivência e deformidades, e a análise metabolômica

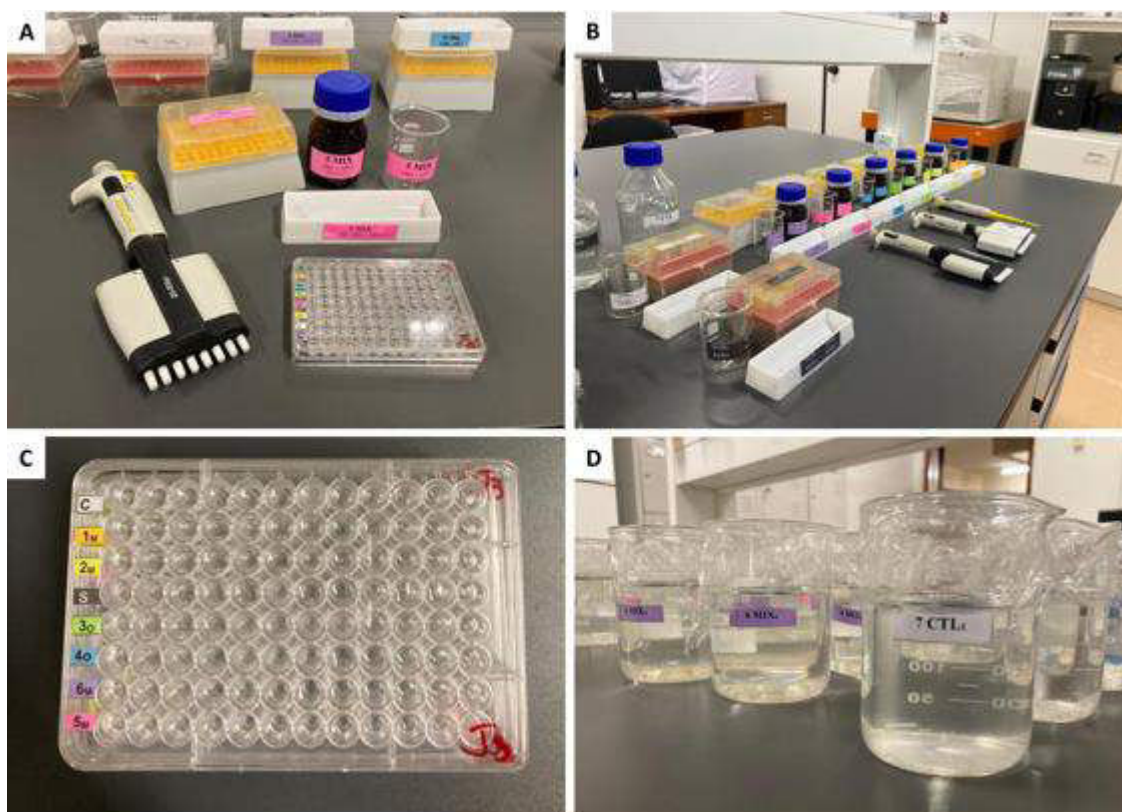


Figura 3. Teste de toxicidade do embrião de peixe de *Rhamdia quelen* exposto a compostos químicos inorgânicos e orgânicos do rio Doce. A. Cada grupo de tratamento foi etiquetado com uma cor diferente para ajudar na identificação adequada durante a troca de soluções. B. Diferentes grupos de tratamento. C. Desenho experimental de exposição de embriões de peixe em microplacas de 96 poços para análise de sobrevivência e taxas de deformidades. D. Exposição de embriões de peixes em béqueres de 250 ml para análise metabolômica.

4. Detecção de metabólitos de HPA na bile dos peixes do Rio Doce

A concentração de metabólitos de HPA na bile foi determinada de acordo com o método proposto por Lin et al (1996) com modificações, de acordo com Hanson & Larsson (2008). A análise foi realizada no Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR em Outubro de 2020. A bile coletada em pools de 3 indivíduos foi descongelada e diluída em Etanol 48% (Merck, 1:500 para lambaris e 1:300 para bagres) e plaqueadas (200 µl) em microplacas de 96 poços pretas. A leitura da fluorescência foi realizada de acordo com o número de anéis do HPA (2 anéis a 6 anéis de 288 a 422 nm, TABELA 1) no leitor de microplaca VarioskanTM LUX multimode (Thermo Scientific), o qual permite a detecção de comprimentos de onda de fluorescência com amplo espectro. A concentração de HPA foi calculada através da equação da reta gerada com a curva padrão de HPA (13 pontos da curva), diluída em metanol 50%, para cada classe de anéis. Para desconsiderar o efeito do solvente, foi descontado o valor da fluorescência do branco contendo etanol 50%.

TABELA 1- Comprimentos de onda correspondentes para cada classe de HPA e seus respectivos padrões utilizados na curva padrão.

Metabólitos HPA	Padrão HPA	Curva Padrão (ng/ml)	λ Exc/Em
2 anéis	Naftaleno	0,72 a 3000	288/330
3 anéis	Fenantreno	0,24 a 1000	260/380
4 anéis	Criseno	0,19 a 800	334/376
5 anéis	Benzo[a]pireno	0,14 a 600	364/406
6 anéis	Benzoperylene	0,05 a 200	380/422

Localidade	Espécie	2 anéis		4 anéis		5 anéis		6 anéis	
Verão									
GUA	<i>Astyanax lacustris</i>	32,68	± 23,20	5,15	± 0,84	5,85	± 1,28	1,27	± 0,29
	<i>Geophagus brasiliensis</i>	4,20	0,00	1,03	0,00	0,28	0,00	0,13	0,00
	<i>Hoplias intermedius</i>	12,76	± 13,05	13,50	± 10,02	9,28	± 8,22	3,33	± 2,87
	<i>Rhamdia quelen</i>	82,26	± 67,17	5,91	± 3,54	1,21	± 0,81	0,59	± 0,40
CAN	<i>Astyanax lacustris</i>	29,89	± 21,08	10,98	± 6,94	15,10	± 10,82	2,90	± 2,14
	<i>Geophagus brasiliensis</i>	112,83	0,00	10,21	0,00	2,92	0,00	1,65	0,00
	<i>Hoplias intermedius</i>	8,80	0,00	10,83	0,00	7,79	0,00	2,80	0,00
NAQ	<i>Trachelyopterus striatulus</i>	41,59	± 23,05	5,25	± 0,31	2,51	± 2,21	0,98	± 0,75
	<i>Astyanax lacustris</i>	15,25	± 21,56	13,20	± 3,13	17,53	± 6,14	3,76	± 0,90
	<i>Pimelodus maculatus</i>	71,64	± 20,43	13,28	± 13,29	1,74	± 1,75	0,72	± 0,79
REF	<i>Astyanax lacustris</i>	43,03	± 1,52	5,55	± 1,42	7,99	± 2,39	1,39	± 0,36
	<i>Geophagus brasiliensis</i>	27,71	0,00	16,41	0,00	12,42	0,00	2,93	0,00
	<i>Pimelodus maculatus</i>	60,68	0,00	3,54	0,00	0,82	0,00	0,48	0,00
	<i>Pseudauchenipterus affinis</i>	39,01	0,00	2,50	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00
GOV	<i>Astyanax lacustris</i>	32,07	± 18,32	14,39	± 5,15	16,11	± 6,82	2,93	± 1,32
	<i>Geophagus brasiliensis</i>	90,49	0,00	15,50	0,00	3,90	0,00	1,84	0,00
	<i>Pimelodus maculatus</i>	123,35	0,00	7,68	0,00	1,39	0,00	0,65	0,00
AIM	<i>Astyanax lacustris</i>	9,65	± 7,07	12,79	± 2,21	17,16	± 4,31	3,03	± 0,62
	<i>Oreochromis niloticus</i>	3,85	0,00	1,16	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
	<i>Pimelodus maculatus</i>	99,06	± 33,96	1,60	± 1,49	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
COL	<i>Astyanax lacustris</i>	56,68	± 23,23	2,84	± 0,22	2,54	± 3,21	0,47	± 0,66
	<i>Oreochromis niloticus</i>	26,13	0,00	2,62	0,00	1,37	0,00	0,41	0,00
	<i>Pimelodus maculatus</i>	51,26	± 23,36	5,50	± 3,34	1,26	± 0,79	0,64	± 0,48
	<i>Pseudauchenipterus affinis</i>	59,21	0,00	4,11	0,00	0,51	0,00	0,34	0,00
LIN	<i>Astyanax lacustris</i>	28,34	± 18,65	11,83	± 4,13	16,59	± 5,61	3,18	± 0,93
	<i>Geophagus brasiliensis</i>	55,13	0,00	6,44	0,00	1,38	0,00	0,71	0,00
	<i>Pimelodus maculatus</i>	56,16	± 54,27	4,05	± 0,66	0,72	± 0,28	0,37	± 0,05
INVERNO	<i>Astyanax lacustris</i>	27,98	0,00	6,18	0,00	5,09	0,00	0,95	0,00
GUA	<i>Geophagus brasiliensis</i>	173,34	0,00	5,72	0,00	0,77	0,00	0,09	0,00
	<i>Rhamdia quelen</i>	98,99	± 106,44	4,57	± 0,94	0,44	± 0,37	0,06	± 0,07
CAN	<i>Astyanax lacustris</i>	24,59	± 5,90	6,61	± 2,67	7,63	± 3,07	1,29	± 0,64
	<i>Geophagus brasiliensis</i>	80,26	± 56,27	3,80	± 0,77	1,08	± 0,26	0,26	± 0,16
NAQ	<i>Astyanax lacustris</i>	44,94	± 25,40	20,17	± 10,48	16,39	± 8,39	3,49	± 1,93
	<i>Pimelodus maculatus</i>	92,38	± 33,89	17,23	± 5,40	2,17	± 0,75	1,16	± 0,37
REF	<i>Astyanax lacustris</i>	6,91	± 0,40	9,67	± 3,00	12,30	± 3,32	2,56	± 0,16
	<i>Pimelodus maculatus</i>	69,74	± 13,41	4,00	± 1,87	0,10	± 0,16	0,01	± 0,01
GOV	<i>Astyanax lacustris</i>	32,45	± 9,30	15,95	± 1,17	13,22	± 1,96	2,47	± 0,29
	<i>Pimelodus maculatus</i>	47,45	± 24,71	13,96	± 2,05	1,70	± 0,31	0,77	± 0,42
AIM	<i>Astyanax lacustris</i>	34,96	± 20,58	10,33	± 4,63	13,27	± 7,22	2,43	± 1,58
	<i>Pimelodus maculatus</i>	27,54	± 8,94	4,92	± 1,11	0,65	± 0,30	0,37	± 0,18
COL	<i>Astyanax lacustris</i>	17,35		7,81	0,00	9,53	0,00	1,78	0,00
	<i>Pimelodus maculatus</i>	68,77	± 23,58	3,06	± 0,82	0,51	± 0,14	0,28	± 0,13
LIN	<i>Astyanax lacustris</i>	40,40	± 15,10	7,86	± 1,57	9,77	± 2,21	1,95	± 0,63
	<i>Pimelodus maculatus</i>	120,90	± 43,55	2,31	± 2,03	0,82	± 0,53	0,53	± 0,50

REFERÊNCIAS

- Aguirre, J. D., & Culotta, V. C. (2012). Battles with iron: Manganese in oxidative stress protection. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13541–13548. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.312181>
- Almeida, C. A. De. (2007). Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios. USP, São Carlos.
- ANA, A. N. de águas. (2015). *Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG*. Brasília - DF.
- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, A., Norrgren, L., & Petersen, G. I. (2003). Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 134(3), 365–374. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12643983>
- Arukwe, A., & Goksøyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-4>
- ATSDR. (2013). Chromium (Cr) Toxicity: What Are the Physiologic Effects of Chromium Exposure? | ATSDR - Environmental Medicine & Environmental Health Education - CSEM. Retrieved March 24, 2016, from <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=10&po=10>
- ATSDR, A. for T. S. and D. R. (2007). ATSDR - Toxicological Profile: Lead. Retrieved March 25, 2016, from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22>
- ATSDR, A. for T. S. and D. R. (2014). Priority List of Hazardous Substances. Retrieved from 4770 Buford Hwy NE Atlanta, GA 30341 USA website: <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>
- Barrera, E. A. L. (2013). *Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de Rhamdia quelen e da coexposição com Benzo(a) pireno em indivíduos adultos*. Universidade Federal do Paraná.
- Bartzke, M., Delov, V., Stahlschmidt-Allner, P., Allner, B., & Oehlmann, J. (2010). Integrating the fish embryo toxicity test as triad element for sediment toxicity assessment based on the Water Framework Directive approach. *Journal of Soils and Sediments*, 10(3), 389–399. <https://doi.org/10.1007/s11368-009-0170-1>
- Baumann, L., Holbech, H., Schmidt-Posthaus, H., Moissl, A. P., Hennies, M., Tiedemann, J., ... Braunbeck, T. (2020). Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (*Danio rerio*)? *Chemosphere*, 238, 124589. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124589>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Biodiversidade, D. D. E., & Biota, M. G. (2009). Instituto estadual de florestas — mg. *Flora*, 1–40.
- Boelsterli, U. A. (2007). *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets* (Second Edi; U. A. Boelsterli, Ed.). Bosa Roca, United States: Taylor & Francis Inc, CRC Press.
- Borba, R. P., Figueiredo, B. R., & Matschullat, J. (2003). Geochemical distribution of

- arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. *Environmental Geology*, 44, 39–52.
<https://doi.org/10.1007/s00254-003-0766-5>
- Bowen, R. E., & Depledge, M. H. (2006). Rapid Assessment of Marine Pollution (RAMP). *Marine Pollution Bulletin*, 53(10), 631–639.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.09.002>
- Bressler, J. P., & Goldstein, G. W. (1991). Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 41(4), 479–484. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90617-E](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90617-E)
- BRITO, I. D. A. (2015). AVALIAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DA ÁGUA DO ALTO IGUAÇU, UTILIZANDO Rhamdia quelen (QUOY e GAIMARD, 1824) COMO MODELO DE ESTUDO (UFPR, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Brito, I. de A., López-Barrera, E. A., Araújo, S. B. L., & Ribeiro, C. A. de O. (2017). Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. *Ecological Modelling*, 347, 40–49.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.12.017>
- Browning, J., & Thomas, N. (2016). An assessment of the tsunami risk in Muscat and Salalah, Oman, based on estimations of probable maximum loss. *International Journal of Disaster Risk Reduction*, 16, 75–87.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdrr.2016.02.002>
- Bui, T. T., Giovanoulis, G., Cousins, A. P., Magnér, J., Cousins, I. T., & de Wit, C. A. (2016). Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *The Science of the Total Environment*, 541, 451–467.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.036>
- Cachada, A., Ferreira da Silva, E., Duarte, A. C., & Pereira, R. (2016). Risk assessment of urban soils contamination: The particular case of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Science of the Total Environment*, 551–552, 271–284.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.012>
- Camargo, O. A., Moniz, A. C., Jorge, J. A., & Valadares, J. M. A. S. (2009). *Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas*. Retrieved from
http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/docs/Boletim_Tecnico_106_rev_atual_2009.pdf
- Campion, S., Aubrecht, J., Boekelheide, K., Brewster, D. W., Vaidya, V. S., Anderson, L., ... Goodsaid, F. (2013). The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9(11), 1391–1408.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2013.827170>
- Carballo, M., Aguayo, S., De La Torre, A., & Muñoz, M. J. (2005). Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. *Science of the Total Environment*, 341(1–3), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.08.021>
- Carvalho, C. D. S., Bernusso, V. A., Araújo, H. S. S. De, Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89(1), 60–69.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>
- Cavalcante, R. M., Filho, N. S. M., Viana, R. B., Oliveira, I. R. N., Nascimento, R. F., Silveira, E. R., & Freire, G. S. S. (2007). UTILIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) NA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM MATRIZES AQUOSAS AMBIENTAIS. In

- Quim. Nova* (Vol. 30).
- CCME, C. C. of M. of the E. (1999). Protocol for the derivation of canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. In *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*. Retrieved from ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/226/
- Chovanec, A., Hofer, R., & Schiemer, F. (2003). Chapter 18 Fish as bioindicators. *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment*, 6(C), 639–676. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80148-0](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80148-0)
- CONAMA. (2012). Resoluções do Conama: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012. In *Ministerio do Meio Ambiente*. Brasília.
- CPRM, S. G. do B. (2015). *Monitoramento Especial da bacia do Rio Doce: Relatório 02 Geoquímica*. Retrieved from http://www.cprm.gov.br/%0Dpublicue/media/RT_02_2015_MONIT_ESP_BACIA_RIO_DOCE_v4_5.pdf.
- Cruz, M. A. S., Santos, L. T. S. de O., Lima, L. G. L. M., & Jesus, T. B. de. (2013). Caracterização granulométrica e mineralógica dos sedimentos como suporte para análise de contaminação ambiental em nascentes do rio Subaé, Feira de Santana (BA). *Geochimica Brasiliensis*, 27(1), 49–62. <https://doi.org/10.5327/z0102-9800201300010005>
- da Penha Rhodes, V., de Lena, J. C., Santolin, C. V. A., da Silva Pinto, T., Mendes, L. A., & Windmöller, C. C. (2018). Speciation and quantification of Hg in sediments contaminated by artisanal gold mining in the Gualaxo do Norte River, Minas Gerais, SE, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(1). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6394-4>
- de Andrade Brito, I., Arruda Freire, C., Yamamoto, F. Y., Silva de Assis, H. C., Rodrigues Souza-Bastos, L., Cestari, M. M., ... de Oliveira Ribeiro, C. A. (2012). Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(2), 615. <https://doi.org/10.1039/c2em10461j>
- de Andrade Brito, I., Garcia, J. R. E., Salaroli, A. B., Figueira, R. C. L., de Castro Martins, C., Neto, A. C., ... de Oliveira Ribeiro, C. A. (2018). Embryo toxicity assay in the fish species *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptaridae) to assess water quality in the Upper Iguaçu basin (Parana, Brazil). *Chemosphere*, 208, 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.009>
- de Oliveira Ribeiro, C. A., Belger, L., Pelletier, E., & Rouleau, C. (2002). Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, 90(3), 217–225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477467>
- DeAngelis, D. L., & Grimm, V. (2014). Individual-based models in ecology after four decades. *F1000prime Reports*, 6, 39. <https://doi.org/10.12703/P6-39>
- Denier, X., Hill, E. M., Rotchell, J., & Minier, C. (2009). Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(4), 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.01.006>
- Dergam, J. A., Ferreira, F. F., & Pinho, F. M. (2017). *Primeiro levantamento de ictiofauna da bacia do Rio Doce após o rompimento da barragem de rejeito da Samarco, em Mariana-MG*. (31), 38.
- Desforges, J. P. W., Peachey, B. D. L., Sanderson, P. M., White, P. a., & Blais, J. M. (2010). Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. *Environmental Pollution*,

- 158(10), 3279–3284. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.017>
- Diamanti-Kandarakis, E. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.
- Dixon, K. R. (2012). *Modeling and Simulation in Ecotoxicology with Applications in MATLAB and Simulink* (CRC Press, Ed.). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Do Nascimento, L. P., Reis, D. A., Roeser, H. M. P., & Santiago, A. da F. (2018). Geochemical assessment of metals in fluvial systems affected by anthropogenic activities in the iron quadrangl. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 23(4), 767–778. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522018165852>
- dos Santos, D. M., Santos, G. S., Cestari, M. M., de Oliveira Ribeiro, C. A., de Assis, H. C. S., Yamamoto, F., ... Montone, R. C. (2014). Bioaccumulation of butyltins and liver damage in the demersal fish *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 3166–3174. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2280-y>
- dos Santos, D.R., Yamamoto, F. Y., Filipak Neto, F., Randi, M. A. F., Garcia, J. E., Costa, D. D. M., ... de Oliveira Ribeiro, C. A. (2016). The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply—Southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10). <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>
- Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., ... Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>
- Engel, D. W., & Brouwer, M. (1989). *Metallothionein and Metallothionein-Like Proteins: Physiological Importance*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74510-2_3
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic Metals inducing oxidative stress.pdf. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 529–539.
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Fedoruk, O., Sokolova, I. M., & Stoliar, O. (2016). Endocrine activities and cellular stress responses in the marsh frog *Pelophylax ridibundus* exposed to cobalt, zinc and their organic nanocomplexes. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 170, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.006>
- Fernandes, D., & Porte, C. (2013). Hydroxylated PAHs alter the synthesis of androgens and estrogens in subcellular fractions of carp gonads. *Science of the Total Environment*, 447, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.068>
- Fernsebner, K., Zorn, J., & Kanawati, B. (2014). *Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe (II)/(III) in rat brain tissue*. 921–931. <https://doi.org/10.1039/c4mt00022f>
- Folle, N. M. T. (2018). Efeito tóxico e papel desregulador endócrino estrogênio do 2, 4, 6 - tribromofenol (TBF) em peixes teleósteos (UFPR, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). Retrieved from <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/57835>
- GIAIA, G. I. para A. de I. A. (2016). *RELATÓRIO-TÉCNICO DETERMINAÇÃO DE METAIS NA BACIA DO RIO DOCE (PERÍODO: DEZEMBRO-2015 A ABRIL-2016)*.
- Gilannejad, N., Dorafshan, S., Paykan, F., Mahboobi, N., Asadollah, S., Martos-sitcha, J. A., ... Martínez-rodríguez, G. (2016). *Vitellogenin expression in wild cyprinid *Petroleuciscus esfahani* as a biomarker of endocrine disruption along the*

- Zayandeh Roud River , Iran. 144, 1342–1350.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.106>
- Gledhill, M., & Van Kirk, R. W. (2011). Modeling effects of toxin exposure in fish on long-term population size, with an application to selenium toxicity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Ecological Modelling*, 222(19), 3587–3597.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2011.08.023>
- Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Miranda, T. O., Pereira, T. M., Merçon, J., Davel, V. C., ... Ramos, J. P. L. (2019). Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 79(4), 659–664.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.188086>
- Gomes, L. de C., Golombieski, J. I., Gomes, A. R. C., & Baldisserotto, B. (2000). Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, 30(1), 179–185. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782000000100029>
- Grimm, V., Berger, U., Bastiansen, F., Eliassen, S., Ginot, V., Giske, J., ... DeAngelis, D. L. (2006). A standard protocol for describing individual-based and agent-based models. *Ecological Modelling*, 198(1), 115–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.04.023>
- Gunasekera, R., Ishizawa, O., Aubrecht, C., Blankespoor, B., Murray, S., Pomonis, A., & Daniell, J. (2015). Developing an adaptive global exposure model to support the generation of country disaster risk profiles. *Earth-Science Reviews*, 150, 594–608.
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2015.08.012>
- Gupta, R. C. (2014). *Biomarkers in Toxicology* (A. Press, Ed.). Retrieved from <https://books.google.com/books?id=EMpUAgAAQBAJ&pgis=1>
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., Campos, S., ... Ribeiro, C. A. O. (2015). Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environmental Science and Pollution Research International*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4911-y>
- Hampl, R., Kubátová, J., & Stárka, L. (2014a). open questions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.013>
- Hampl, R., Kubátová, J., & Stárka, L. (2014b). Steroids and endocrine disruptors- History, recent state of art and open questions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.013>
- Hara, A., Hirano, K., Shimizu, M., & Fukada, H. (2007). Characterization of Yolk Proteins , Development of Immunoassays and Use as Biomarker of Exposure to Environmental Estrogens. *Environmental Sciences*, 14(2), 95–108.
- Hass, U., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Vinggaard, A. M., Taxvig, C., ... Axelstad, M. (2012). Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.090>
- Hatje, V., Pedreira, R. M. A., De Rezende, C. E., Schettini, C. A. F., De Souza, G. C., Marin, D. C., & Hackspacher, P. C. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>
- Hiramatsu, N., Cheek, A. O., Sullivan, C., Matsubara, T., & Hara, a. (2005). Vitellogenesis and endocrine disruption. *Biochemsitry on Molecular Biology of Fishes*, 6.
- Huang, G. Y., Ying, G. G., Liang, Y. Q., Liu, S. S., & Liu, Y. S. (2014). Expression patterns of metallothionein, cytochrome P450 1A and vitellogenin genes in

- western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105(1), 97–102.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.012>
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Nannou, C., Nakis, L., Ruhí, A., Acuña, V., ... Barcelo, D. (2015). Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Science of the Total Environment*, 540, 241–249.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.049>
- Iavicoli, I., Fontana, L., & Bergamaschi, A. (2009). The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 12(3), 206–223. <https://doi.org/10.1080/10937400902902062>
- IBAMA, I. B. do M. A. e dos R. N. R. (2015). *Laudo Técnico Preliminar - Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais*.
- Jacobsen, P. R., Christiansen, S., Boberg, J., Nellemann, C., & Hass, U. (2010). Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *International Journal of Andrology*, 33(2), 434–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01046.x>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Kapoor, B. G., & Khanna, B. (2004). *Ichthyology Handbook*. Retrieved from https://books.google.com/books/about/Ichthyology_Handbook.html?id=I7WhoPBdAooC&pgis=1
- Kaur, G., Kumar, V., Arora, A., Tomar, A., Ashish, Sur, R., & Dutta, D. (2017). Affected energy metabolism under manganese stress governs cellular toxicity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12004-3>
- Kennedy, C. J., & Smyth, K. R. (2015). Disruption of the rainbow trout reproductive endocrine axis by the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 102–111.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.03.013>
- Kirsch-Volders, M., Gonzalez, L., Carmichael, P., & Kirkland, D. (2009). Risk assessment of genotoxic mutagens with thresholds: a brief introduction. *Mutation Research*, 678(2), 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.001>
- Kühnel, D., & Nickel, C. (2014). The OECD expert meeting on ecotoxicology and environmental fate--towards the development of improved OECD guidelines for the testing of nanomaterials. *The Science of the Total Environment*, 472, 347–353.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.055>
- Laane, R. W. P. M., Vethaak, A. D., Gandrass, J., Vorkamp, K., Köhler, A., Larsen, M. M., & Strand, J. (2013). Chemical contaminants in the Wadden Sea: Sources, transport, fate and effects. *Journal of Sea Research*, 82, 10–53.
<https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.03.004>
- Leão, L. P., Costa, R. de V. F., Leite, M. G. P., & Júnior, H. A. N. (2019). Mapeamento Geoquímico do Manganês e Avaliação da Qualidade de Sedimentos Fluviais e Águas Superficiais do Quadrilátero Ferrífero, Brasil Manganese Geochemical Mapping and Quality Assessment of Fluvial Sediments and Surface Waters of Quadrilátero Ferrífero. *Anuário Do Instituto de Geociências - UFRJ*, 42, 444–455.
https://doi.org/DOI: http://dx.doi.org/10.11137/2019_2_444_455
- Leguen, I., Cravedi, J. P., Pisam, M., & Prunet, P. (2001). Biological functions of trout pavement-like gill cells in primary culture on solid support: pH_i regulation, cell

- volume regulation and xenobiotic biotransformation. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 128(2), 207–222. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00293-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00293-2)
- Leguen, Isabelle. (2018). Gills of the medaka (*Oryzias latipes*): A scanning electron microscopy study. *Journal of Morphology*, 279(1), 97–108. <https://doi.org/10.1002/jmor.20757>
- Leino, R. L., Jensen, K. M., & Ankley, G. T. (2005). Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.05.010>
- Li, L., & Yang, X. (2018). The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: Links and interactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7580707>
- Liebert, M. A., & Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 29.
- Lima, A. da C. (2008). *Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em águas superficiais nos Rios Piracicaba e Doce, Ipatinga - MG, utilizando a técnica de EFS - CLAE - DAD*. Universidade Federal de Ouro Preto.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Marin, M. G., & Matozzo, V. (2004). Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10), 835–839. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.037>
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., & Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 34(4), 531–545. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.008>
- Matthias Peter Roeser, H., & Angelika Roeser, P. (2010). O QUADRILÁTERO FERRÍFERO -MG, BRASIL: ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA, SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS AMBIENTAIS RELACIONADOS. *GEONOMOS*, 18(1), 33–37.
- Mechi, A., & Sanches, D. L. (2010). Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. *Estudos Avançados*, 24(68), 209–220. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000100016>
- Mela, M., Randi, M. A. F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.013>
- Migliore, L., & Coppedè, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.013>
- Miranda, L. S., & Marques, A. C. (2016). Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna – an example from the staurozoans (Cnidaria). *Biota Neotropica*, 16(2), 1–3. <https://doi.org/10.1590/1676-0611>
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., & de Sostoa, A. (2014). Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *The Science of the Total Environment*, 487, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.134>

- Moura Costa, D. D., Bozza, D. A., Rizzo, L. E., Garcia, J., Costa, M. D. M., & de Oliveira Ribeiro, C. A. (2016). Characterization, specificity and sensibility of produced anti-Rhamdia quelen vitellogenin in Brazilian fish species. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0252-0>
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal : The Journal of Medical Association of Malawi*, 24(3), 69–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3576830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nagler, J. J., Davis, T. L., Modi, N., Vijayan, M. M., & Schultz, I. (2010). Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 167(2), 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.022>
- Naigaga, I., Kaiser, H., Muller, W. J., Ojok, L., Mbabazi, D., Magezi, G., & Muhumuza, E. (2011). Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria wetlands, Uganda. *Physics and Chemistry of the Earth*, 36(14–15), 918–928. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.07.066>
- Nicolas, J. M. (1999). Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology*, 45(2–3), 77–90. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00095-2)
- Norberg, G. F., Gerhadsen, L., Mumtaz, M., Ruiz, P., & Fowler, B. A. (2015). Handbook on the toxicology of metals. In *Chemosphere* (Fourth Edi, Vol. 9). [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(80\)90137-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(80)90137-X)
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing*, (July), 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Olive, P. L. (1988). DNA precipitation assay: A rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 11(4), 487–495. <https://doi.org/10.1002/em.2850110409>
- Osório, F. H. T., Silva, L. F. O., Piancini, L. D. S., Azevedo, A. C. B., Liebel, S., Yamamoto, F. Y., ... de Oliveira Ribeiro, C. A. (2014). Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(15), 9145–9160. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1512-5>
- Özaslan, M. S., Demir, Y., Küfrevioğlu, O. I., & Çiftci, M. (2017). Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Van Lake fish gills. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(11). <https://doi.org/10.1002/jbt.21967>
- Plessl, C., Otachi, E. O., Körner, W., Avenant-Oldewage, A., & Jirsa, F. (2017). Fish as bioindicators for trace element pollution from two contrasting lakes in the Eastern Rift Valley, Kenya: spatial and temporal aspects. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(24), 19767–19776. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9518-z>
- Pundir, C. S., & Chauhan, N. (2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: a review. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>
- Quadra, G. R., Roland, F., Barros, N., Malm, O., Lino, A. S., Azevedo, G. M., ... Campos, J. M. S. (2019). Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. *Chemosphere*, 215, 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.104>

- Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research*, 24(4), 378–399. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>
- Reinen, J., Suter, M. J. F., Vögeli, a. C., Fernandez, M. F., Kiviranta, H., Eggen, R. I. L., & Vermeulen, N. P. E. (2010). Endocrine disrupting chemicals-Linking internal exposure to vitellogenin levels and ovotestis in Abramis brama from Dutch surface waters. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(3), 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.07.004>
- Rey Vázquez, G., Meijide, F. J., Da Cuña, R. H., Lo Nostro, F. L., Piazza, Y. G., Babay, P. A., ... Guerrero, G. A. (2009). Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish Cichlasoma dimerus (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 150(2), 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.012>
- Rodrigues-Galdino, A. M., Maiolino, C. V., Forgati, M., Donatti, L., Mikos, J. D., Carneiro, P. C. F., & Rios, F. S. A. (2010). Development of the neotropical catfish Rhamdia quelen (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. *Zygote*, 18(2), 131–144. <https://doi.org/10.1017/S096719940999013X>
- Rodrigues, A. S. de L., Malafaia, G., Costa, A. T., & Nalini J??nior, H. A. (2014). Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte River basin, Minas Gerais State, Brazil. *Environmental Earth Sciences*, 71(9), 4177–4186. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2808-y>
- Salamat, N. S., Soleimani, Z. ahra S., Safahieh, A. L. S., & Savari, A. H. S. (2013). Using Histopathological Changes as a Biomarker to Trace Contamination Loading of Musa Creeks (Persian Gulf). *Toxicologic Pathology*, 41, 913–920. <https://doi.org/10.1177/0192623312468515>
- Santolin, C. V. A., Ciminelli, V. S. T., Nascentes, C. C., & Windmüller, C. C. (2015). Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. *Environmental Earth Sciences*, 74(2), 1235–1248. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4115-2>
- Santos, Debora Regina, Yamamoto, F. Y., Filipak Neto, F., Randi, M. A. F., Garcia, J. E., Costa, D. D. M., ... de Oliveira Ribeiro, C. A. (2016). The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply-Southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research International*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>
- Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2009). Cadmium, Environmental Exposure, and Health Outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 182–190. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901234>
- Schlenk, D. (2005). Pesticide biotransformation in fish. In T. P. Mommsen (Ed.), *Molecular Biology* (6th ed., Vol. 6). Elsevier.
- Schrader, T. J. (2016). Encyclopedia of Food and Health. In *Encyclopedia of Food and Health*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00476-1>
- Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., ... Batista, B. L. (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>
- Shepard, F. P. (1954). Nomenclature based on Sand-silt-clay ratios. *Journal of Sedimentary Petrology*, 24(3), 151–158. <https://doi.org/10.1097/00006534-195409000-00011>

- Sobus, J. R., Tan, Y.-M., Pleil, J. D., & Sheldon, L. S. (2011). A biomonitoring framework to support exposure and risk assessments. *The Science of the Total Environment*, 409(22), 4875–4884. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.046>
- Strzyzewska, E., Szarek, J., & Babinska, I. (2016). *Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment : a review*. 2016(3), 123–132. <https://doi.org/10.17221/8763-VETMED>
- Sullivan, C. V., & Yilmaz, O. (2018). Vitellogenesis and yolk proteins, fish. In *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edi, Vol. 6). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20567-0>
- Sumpter, J. P., & Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 7), 173–178. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7173>
- Tincani, F. H., Santos, G. S., Azevedo, A. C. B., Marques, A. E. M. L., Pereira, L. S., Castellano, G. C., ... Cestari, M. M. (2019). Climbing the taxonomic ladder: Could a genus be used as bioindicator? The ecotoxicological relationship between biomarkers of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax ribeirae*. *Ecological Indicators*, 106, 105474. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105474>
- Tkatcheva, V., Hyvärinen, H., Kukkonen, J., Ryzhkov, L. P., & Holopainen, I. J. (2004). Toxic effects of mining effluents on fish gills in a subarctic lake system in NW Russia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(3), 278–289. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00079-4)
- US EPA, U. S. E. P. A. (1987). *An overview of Sediment Quality in the United States* (p. 203p). p. 203p. Washington, DC.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Varejão, E. V. V., Bellato, C. R., & Fontes, M. P. F. (2009). Mercury fractionation in stream sediments from the Quadrilátero Ferrífero gold mining region, Minas Gerais State, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 157(1–4), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0522-0>
- Vasconcelos, M. A. R. V., Barbosa, A. F. S., Menezes, M. A. B. C., Silva, M. A., Rückert, G. V., & Oliveira, A. H. de. (2011). METALS IN SURFACE WATERS, MARGIN SEDIMENTS, FORAGE AND CATTLE HAIR IN FLOOD PLAINS OF THE RIO DOCE BASIN, MINAS GERAIS, BRAZIL. *International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011*, 27(28), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.005>
- Veado, M. A. R. V., Menezes, M. Â. D. B. C., Queiroz, M. A. T., Costa, A. A., & Oliveira, A. H. De. (2009). NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS - NAA : STUDIES OF ENVIRONMENTAL POLLUTION IN STEEL VALLEY REGION , BRAZIL. *International Nuclear Atlantic Conference - INAC*. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., ... Bueno dos Reis Martinez, C. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of The Total Environment*, 542, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>
- Vieira, F., Gomes, J. P. C., Maia, B. P., & Silva, L. G. M. (2015). *Peixes do Quadrilátero Ferrífero: guia de identificação (Fish of the Iron Quadrangle:*

- Identification Guide*). Belo Horizonte - MG: Fundação Biodiversitas.
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, Vol. 37, pp. 29–38.
<https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Weber, A. A., Sales, C. F., de Souza Faria, F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2020). Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190(December 2019).
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Wei, K., & Yang, J. (2015). Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 446–453.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.032>
- Wentworth, C. K. (1922). A Scale of Grade and Class Terms for Clastic Sediments. *The Journal of Geology*, 30(5), 377–392. <https://doi.org/10.1086/622910>
- WHO. (2012). *WHO | State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012*. Retrieved from <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>
- Yamamoto, F. Y., Garcia, J. R. E., Kupsco, A., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2017). Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. *Chemosphere*, 186.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.111>
- Yamamoto, F. Y., Pereira, M. V. M., Lottermann, E., Santos, G. S., Stremel, T. R. O., Doria, H. B., ... Ribeiro, C. A. O. (2016). Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). *Environmental Science and Pollution Research*, 1–18.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-6924-6>
- Yi, Y., Yang, Z., & Zhang, S. (2011). Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. *Environmental Pollution*, 159(10), 2575–2585. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.011>
- Yilmaz, O., Patinote, A., Nguyen, T., & Bobe, J. (2018). Multiple vitellogenins in zebrafish (*Danio rerio*): quantitative inventory of genes, transcripts and proteins, and relation to egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(6), 1509–1525.
<https://doi.org/10.1007/s10695-018-0524-y>
- Yilmaz, O., Prat, F., José, A., Amano, H., Koksoy, S., Sullivan, C. V., ... Bazzoli, N. (2015). General and Comparative Endocrinology Ovarian yolk formation in fishes : Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. *General and Comparative Endocrinology*, 221(2), 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.10.002>
- Zhang, S., Dong, Y., & Cui, P. (2015). Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2), 710–715.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.011>
- Zheng, W., Aschner, M., & Gherzi-Egea, J.-F. (2003). *Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research*.
- Zhu, F., Wigh, A., Friedrich, T., Devaux, A., Bony, S., Nugegoda, D., ... Wlodkowic, D. (2015). Automated Lab-on-a-Chip Technology for Fish Embryo Toxicity Tests Performed under Continuous Microperfusion (μ FET). *Environmental Science and Technology*, 49(24), 14570–14578. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03838>

Resultados das atividades realizadas apresentadas no RELATÓRIO II

(01/09/2020 a 31/07/2021)

1. Análises Químicas

Mercúrio na água e no sedimento

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DE METAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA BRUTA

As 48 amostras de água do Rio Doce foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm para promover a decantação do material em suspensão. Posteriormente, as soluções foram analisadas diretamente por nebulização convencional em ICP OES para a quantificação elementar.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DE Hg EM SEDIMENTO

O procedimento foi adaptado de dos Santos *et al.* 2005. As amostras de sedimento foram trituradas em gral de ágata e, posteriormente, passadas em peneira granulométrica de aço inox de 100 µm. Em tubos de polipropileno de 15 mL pesou-se aproximadamente 30 mg da amostra peneirada, na qual foi adicionado 1,5 mL de água régia (HNO₃:HCl). A mistura foi submersa em banho ultrassom por 30 minutos. Após este período, a suspensão foi mantida em repouso por 24 horas com agitação manual ocasional. Após este período, as suspensões foram submetidas novamente a ultrassom por 30 minutos e o volume foi completado com água deionizada até 15 mL. A concentração final de água régia na suspensão foi de 10% v/v. O procedimento foi realizado em duplicata.

DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

Para a determinação instrumental, foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) marca Thermo Scientific, modelo iCAP 6500 com vista axial. Para o transporte das soluções, capilares (Orange/White) 0,64 mm d.i, marca Meinhard Galss Products (USA). Os parâmetros instrumentais são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS ICP OES.

<i>Nebulização convencional</i>		
Radiofrequência		40 MHz
Potência de radiofrequência (RF)		1,15 kW
Vazão do gás do plasma		12,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar		0,5 L min ⁻¹
Vazão do gás de arraste		0,7 L min ⁻¹
Tempo de estabilização		20 s
Replicatas		2
Tocha		Quartzo, vista axial
Linhas analíticas	Al	396,152 nm
	As	193,696 nm
	Cd	228,802 nm
	Co	228,616 nm
	Cr	267,716 nm
	Cu	324,754 nm
	Fe	259,940 nm
	K	766,490 nm
	Li	670,784 nm
	Mg	279,553 nm
	Mn	257,995 nm
	Na	589,592 nm
	Ni	221,647 nm
	Pb	220,353 nm
	Ti	323,452 nm
	V	309,311 nm
	Zn	213,856 nm
<i>Sistema de geração de hidretos</i>		
Vazão da amostra		3,0 mL min ⁻¹
Vazão NaBH ₄		3,0 mL min ⁻¹
Vazão do HCl		3,0 mL min ⁻¹
Concentração de NaBH ₄		1,0% m/v (em 0,4% m/v de NaOH)
Concentração de HCl		6,0 mol L ⁻¹
Linha analítica	Hg	184,950 nm

FONTE: A autora (2021).

As curvas analíticas foram construídas a partir de solução padrão multielementar de 1000 mg/L marca AccuStard, (New Haven, USA) contendo Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, e Zn, para os demais elementos foram utilizadas soluções padrão monoelementares de 1000 mg/L e para Hg 100 mg/L todos da marca AccuStard, (New Haven, USA). A faixa de concentração foi de 1,0 a 2000 µg/L em meio de HNO₃ 1% (v/v) para Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb e Zn. Para determinação de Hg por geração de hidretos, a faixa de concentração foi de 0,1 a 2,0 µg L⁻¹ meio de água régia 10% (v/v) e para As 0,01 a 1,0 µg L⁻¹ em meio de HNO₃ 1% (v/v). As curvas apresentaram um coeficiente de correlação acima de 0,999 para todos os elementos.

Para o preparo das soluções para a geração de hidretos, foi utilizado NaBH₄ P.A. sólido marca Reatec (Brasil), NaOH P.A. marca Synth (Brasil), HCl P.A. marca Reatec (Brasil) previamente destilado e HNO₃ marca Merck (Alemanha).

RESULTADOS

A análise química do mercúrio dissolvido na água realizada pelo Grupo de Química Ambiental da UFPR, detectou apenas concentrações abaixo dos limites de quantificação nas amostras coletadas no Rio Doce no verão e inverno de 2019 (Figura 1).

Figura 1. Detecção do mercúrio dissolvido em amostras de água do Rio Doce coletadas no verão e inverno de 2019.

RESULTADOS AMOSTRAS									
ELEMENTO	LOQ (µg/L)	Incerteza		RESULTADO FINAL: CONCENTRAÇÃO NAS AMOSTRAS				CONCLUSÃO FINAL	
Hg1849	0.1	0.02	Verão 2015	AMOSTRAS	Hg1849 (µg/L)			AMOSTRAS	Hg1849
				1	-0.0907			1	<LOQ
				2	-0.132			2	<LOQ
				3	0.0026			3	<LOQ
				4	-0.0992			4	<LOQ
				5	-0.0747			5	<LOQ
				6	-0.017			6	<LOQ
				7	-0.029			7	<LOQ
				8	-0.1319			8	<LOQ
				9	-0.0747			9	<LOQ
				10	-0.0782			10	<LOQ
				11	-0.0271			11	<LOQ
				12	-0.0546			12	<LOQ
				13	-0.0487			13	<LOQ
				14	-0.0222			14	<LOQ
				15	-0.1591			15	<LOQ
				16	-0.0882			16	<LOQ
				17	-0.139			17	<LOQ
				18	-0.0421			18	<LOQ
				19	-0.0826			19	<LOQ
				20	-0.0504			20	<LOQ
				21	-0.0704			21	<LOQ
				22	-0.1181			22	<LOQ
				23	-0.0427			23	<LOQ
				24	-0.0589			24	<LOQ

RESULTADOS AMOSTRAS									
ELEMENTO	LOQ (µg/L)	Incerteza		RESULTADO FINAL: CONCENTRAÇÃO NAS AMOSTRAS				CONCLUSÃO FINAL	
Hg1849	0.1	0.02	Inverno 20	AMOSTRAS	Hg1849 (µg/L)			AMOSTRAS	Hg1849
			Gua a	25	0.0607			25	<LOQ
			Gua b	26	0.0447			26	<LOQ
			Gua c	27	0.0351			27	<LOQ
			Can a	28	0.064			28	<LOQ
			Can b	29	0.0564			29	<LOQ
			Can c	30	0.052			30	<LOQ
			Naq a	31	0.0146			31	<LOQ
			Naq b	32	0.0572			32	<LOQ
			Naq c	33	-0.0326			33	<LOQ
			Ref a	34	-0.0144			34	<LOQ
			Ref b	35	0.0095			35	<LOQ
			ref c	36	0.0773			36	<LOQ
			Gov a	37	-0.0191			37	<LOQ
			Gov b	38	-0.0509			38	<LOQ
			Gov c	39	0.0255			39	<LOQ
			Aim a	40	0.012			40	<LOQ
			Aim b	41	0.0077			41	<LOQ
			Aim c	42	-0.0116			42	<LOQ
			Col a	43	0.008			43	<LOQ
			Col b	44	-0.0227			44	<LOQ
			Col c	45	0.0033			45	<LOQ
			Lin a	46	-0.0136			46	<LOQ
			Lin b	47	0.0417			47	<LOQ
			Lin c	48	0.0721			48	<LOQ

Apesar de não ter sido detectado na água, o mercúrio foi detectado em 25 das 48 amostras de sedimento do Rio Doce. Conforme o esperado, observou-se que os pontos do Alto Rio Doce, principalmente o Gualaxo do Norte no inverno (Tabela 2), apresentou os maiores níveis de mercúrio no sedimento. Neste local, os valores (1,64 µg/g) foram superiores até 3 vezes o limite do Conama (0,48 µg/g). Os dados corroboram com os valores reportados pela literatura, a qual indica a atividade de mineração como principal fonte deste elemento no Alto Rio Doce.

Tabela 2. Concentrações de mercúrio detectadas em amostras do sedimento do Rio Doce.

Sites		Hg (µg/g)
CONAMA	Level 1	0.17
	Level 2	0.48
	Sum	<LOQ
GUA	Win	1.64 ± 0.89
	Sum	0.09
CAN	Win	0.39
	Sum	0.09
NAQ	Win	0.11 ±0.02
	Sum	<LOQ
REF	Win	0.40 ± 0.05
	Sum	0.14
GOV	Win	0.30 ±0.11
	Sum	0.12 ± 0.02
AIM	Win	0.43 ±0.27
	Sum	0.08 ± 0.02
COL	Win	0.17 ±0.05
	Sum	0.07
LIN	Win	0.17

2. Índices da Qualidade do Sedimento

A toxicidade potencial dos contaminantes inorgânicos e dos HPA detectados em amostras de sedimento do Rio Doce foi avaliada inicialmente através da comparação com os níveis de efeito limite (TEL) e níveis de efeito provável (PEL) propostos pelo Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (CCME, 1999) de acordo com a Tabela 3. Os HPA individuais (12 HPA prioritários) e os HPA totais foram comparados para estimar a frequência das amostras que excedem os valores TEL e PEL. Além disso, valores regionais de PAHs totais propostos por Choueri et al. (2009) e Moreira et al. (2021) foram usados para calcular o quociente das “Diretrizes de Qualidade de Sedimentos” (SQGq). O SQGq médio considerando os registros em cada ponto do Rio Doce foi calculado dividindo-se as concentrações totais de elementos traços ou HPA nas amostras de sedimento por suas respectivas concentrações de efeito provável obtidas na literatura citada. O SQGq médio foi classificado com base em Fairey et al. (2001) e Moreira et al. (2021): i) 0 a 0,1 = contaminação mínima com baixo risco de toxicidade; ii) 0,1 a 0,25 = contaminação moderada, pode produzir toxicidade; iii) <0,25 = contaminação forte, produz toxicidade.

Verificou-se que 23% das amostras de GUA excederam os níveis de efeito provável (PEL), segundo CCME, (1999) e apresentaram o maior quociente de Diretriz de Qualidade de Sedimentos (1,03), indicando o pior cenário de poluição. Porém, merece destaque outros locais (CAN, NAQ e GOV) que também mostraram taxas significativas de amostras excedendo os níveis de efeito de limiar e SQGq relativamente alto, indicando poluição moderada a alta por produtos químicos inorgânicos

O somatório de PAH e SQGq indicou que COL (inverno. 0,39 Σ PAH; 0,28 SQGq) e NAQ (verão. 0,53 Σ PAH; 0,31 SQGq) representaram os locais mais poluídos em termos de ocorrência de PAH, enquanto os locais do Alto Rio Doce apresentaram os níveis mais baixos.

Tabela 3. Comparações com valores guia e os Índices de qualidade de Sedimento para os contaminantes inorgânicos e orgânicos do Rio Doce

		INORGANICS			ORGANICS (PAHs)		
		>TEL	>PEL	SQGq	ΣPAH	>TEL	SQGq
	Sum	8 (38%)	2 (9.5%)	0.39	31.99	1 (7.7%)	0,003
GUA	Win	6 (28%)	5 (23%)	1.03	3.31	1 (7.7%)	0,000
	Sum	4 (19%)	0	0.16	42.33	1 (7.7%)	0,003
CAN	Win	8 (38%)	2 (9.5%)	0.45	33.35	1 (7.7%)	0,003
	Sum	5 (23%)	0	0.20	2726.3	6 (46%)	0,285
NAQ	Win	9 (42%)	2 (9.5%)	0.40	773.84	5 (38%)	0,063
	Sum	3 (14%)	0	0.22	140.75	1 (7.7%)	0,006
REF	Win	6 (28%)	0	0.34	109.82	1 (7.7%)	0,001
	Sum	2 (10%)	0	0.13	1191.9	6 (46%)	0,105
GOV	Win	10 (47%)	2 (9,5%)	0.47	759.71	4 (30%)	0,04
	Sum	2 (9.5%)	0	0.15	125.42	1 (7.7%)	0,058
AIM	Win	1 (4.7%)	0	0.17	225.23	1 (7.7%)	0,011
	Sum	0	0	0.11	1429.3	6 (46%)	0,100
COL	Win	7 (33%)	0	0.26	3639.8	6 (46%)	0,313
	Sum	0	0	0.11	1642.3	6 (46%)	0,150
LIN	Win	0	0	0.11	1080.3	6 (46%)	0,092

3. Análises Moleculares – Ensaio de ELISA

Deteção da vitelogenina através do ELISA de Captura

Reagentes necessários

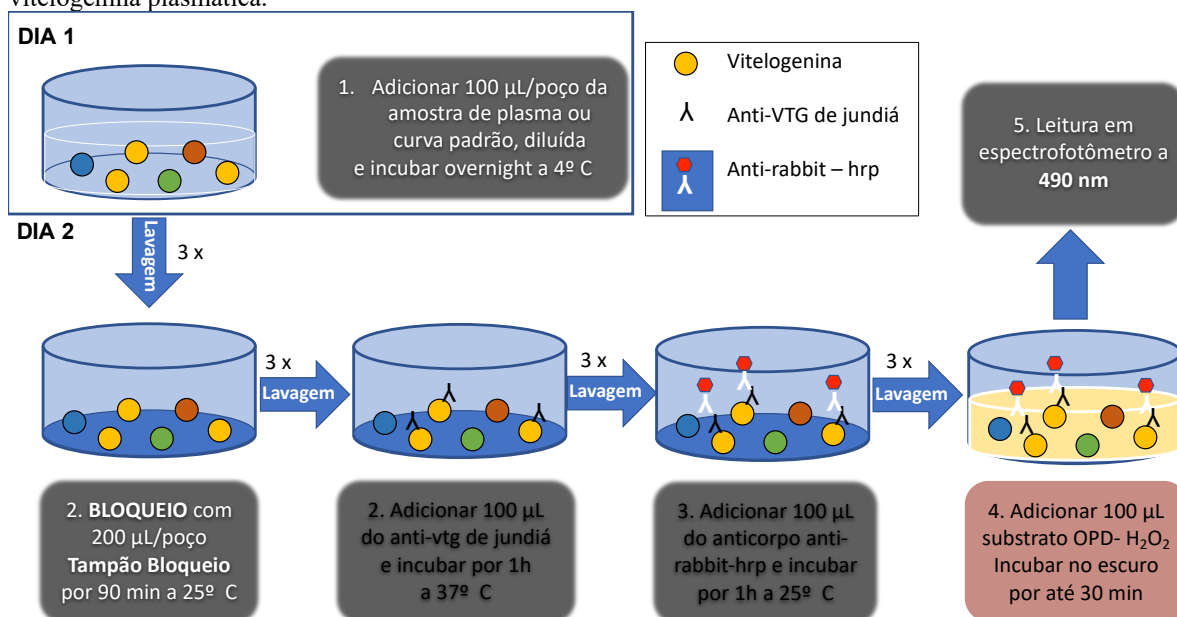
- Tampão Carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6
- Tampão de bloqueio PBS, com BSA a 2%
- Tampão de lavagem PBS-T (Tween-20 1 %)
- Substrato OPD (dicloreto de ortofenilenodiamina, Sigma®, 0,5 mg.ml⁻¹ preparado em buffer de citrato 0,05M com pH 5,0 + H₂O₂ 0,015%)
- Solução de parada H₂SO₄ 2M

A detecção da Vitelogenina foi realizada através do ensaio de ELISA de captura, onde a microplaca é sensibilizada com as amostras contendo a Vitelogenina e os

anticorpos anti-VTG adicionados se ligam de forma específica à proteína de interesse, os quais são posteriormente detectados pela ligação a um anticorpo secundário acoplado a uma enzima HRP que reage na presença de um substrato cromógeno (Figura 2). A reação que emite uma coloração em um comprimento de onda de 490 nm é detectada em um espectrofotômetro, e é diretamente proporcional à concentração de vitelogenina na amostra.

Para a sensibilização foram adicionados 100 ul das amostras de plasma diluídas em Tampão Carbonato/bicarbonato e normalizadas a 2mg.ml nas microplacas de 96 poços (Corning) em duplicata, as quais foram incubadas por 16h a 4°C. Para a curva padrão de Vitelogenina foram adicionadas soluções da vitelogenina de *P. maculatus* previamente purificadas em concentrações que variaram de 80 a 1,5 ug/ml. No dia seguinte foi realizada a lavagem das placas (3 lavagens de 1 minuto cada) com 200 ul de tampão de lavagem para remoção das moléculas não ligadas. Em seguida foi realizado o bloqueio dos espaços vazios através da adição de 200 ul do tampão de bloqueio permanecendo por 90 minutos, em temperatura ambiente (25°C). Após esse período, as placas foram novamente lavadas, sendo então pipetadas 100 ul da solução do anticorpo de captura (anti-VTG de jundiá produzido por Moura Costa et al., 2016) em uma diluição de 2 ug.ml (o melhor anticorpo e a melhor concentração foram definidos previamente através de diferentes testes) permanecendo a 37°C por 1h. Após o período de incubação e lavagem dos anticorpos não ligados, foram pipetados 100 µL da solução de anticorpo de detecção (anti-rabbit, Bio-rad) a 1:3000, permanecendo por 1h a 25°C. Após, as microplacas foram lavadas novamente e, então, foram adicionados 100 µL da solução do substrato enzimático em cada poço. As microplacas foram incubadas no escuro por até 30 min, quando foi feita a leitura da absorbância em 490 nm em um leitor de microplaca Thermo Scientific® Varioskan Lux.

Figura 2. Esquema representativo do Ensaio de Elisa de Captura para a detecção da expressão da vitelogenina plasmática.



a. Quantificação do estradiol plasmático através do ELISA Competitivo

2.1 Dosagem hormonal

A quantificação das concentrações de 17β-estradiol circulante foi realizada somente para *R. quelen*, *H. affinis* e *P. maculatus* e *G. brasiliensis* pois estas espécies apresentaram amostras de plasma sanguíneo suficientes para viabilizar sua quantificação. A concentração de 17β-estradiol presente no plasma dos indivíduos machos e fêmeas das diferentes espécies, localidades e estações amostrais foi determinada através do ensaio de ELISA competitivo de acordo com Brown et al. (2003) e através do uso de kits não-comerciais.

1.1.1 Extração hormonal

A fim de concentrar o estradiol presente nas amostras e viabilizar a dosagem hormonal, foi realizada a extração desse hormônio esteroide adicionando-se solvente éter etílico ao plasma (1000 µL de éter etílico PA, Synth, para cada 200 µL de plasma). A solução, acondicionada em microtubo, foi misturada com o auxílio de um vórtex por um minuto e, em seguida, o microtubo transferido para ultra freezer configurado para -80°C até que a solução estivesse completamente congelada. Após, a fração líquida do solvente contendo as moléculas de 17β-estradiol foi aliqotada em outro microtubo e evaporada à temperatura ambiente (25°) dentro de uma capela com exaustor ligado. Os hormônios, já

precipitados e aderidos ao microtubo, foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4.

1.1.2 Padronizações e preparo das soluções para os ensaios de dosagem

Para os ensaios, foram utilizadas microplacas de 96 poços (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp) e anticorpo anti-17 β -estradiol policlonal R0008 (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA), na diluição de 1:5.000.

Uma solução estoque de lavagem de ELISA (8,7% NaCl, 0,5% Tween 20) foi preparada previamente ao experimento e armazenada à 4°C, sendo diluída 10x para utilização durante as lavagens. O conjugado estradiol-HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) foi diluído na proporção de 1: 100.000 e acondicionado à 4°C até o momento dos ensaios. Já a solução do substrato enzimático (dicloreto de ortofenilenodiamina, Sigma®, 0,5 mg.ml⁻¹ preparado em buffer de citrato 0,05M com pH 5,0 + H₂O₂ 0,015%) foi preparada imediatamente antes de sua adição na microplaca.

Uma curva-padrão foi criada para cada microplaca, a qual foi preparada a partir de 17 β -estradiol (E8875, Sigma-Aldrich) na concentração 25.000 pg/mL. A curva foi diluída na proporção de 1:1, de forma seriada e com solução de ensaio de ELISA (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; BSA; pH ajustado para 7,00), até obter-se concentrações variando entre 12 e 0,01 ng/mL. A leitura das absorbâncias foi realizada à 490 nm, com um leitor de microplaca Thermo Scientific® Varioskan Lux.

1.1.3 Ensaios de dosagem

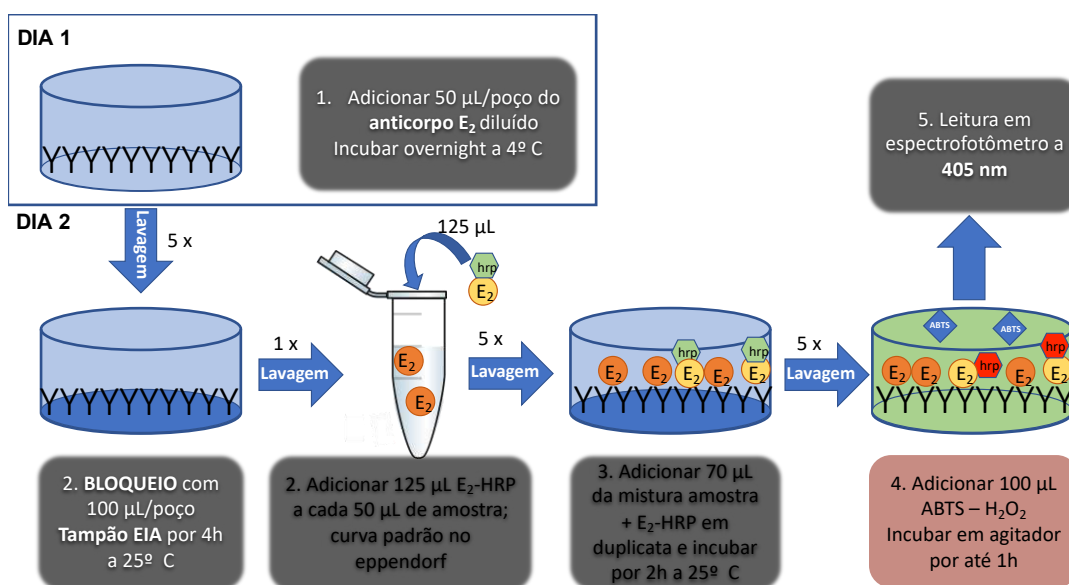
As microplacas foram cobertas com 50 μ L de anticorpo anti-17 β -estradiol e acondicionadas à 4°C por 16 horas (Figura 3). Após, cada microplaca, sensibilizada com anticorpos, foi lavada três vezes com solução de lavagem de ELISA, sendo o excesso de solução retirado batendo-se a microplaca sobre um maço de papel toalha. Posteriormente, realizou-se o bloqueio adicionando-se 50 μ L de solução de ensaio de ELISA em cada poço seguido da incubação das microplacas por três horas, em temperatura ambiente (25°C). Após esse período, as placas foram novamente lavadas, sendo então pipetados, em duplicatas, 20 μ L da amostra + 50 μ L da solução do conjugado enzimático estradiol – HRP em todos os poços, exceto nos poços considerados como branco. Nesse mesmo momento, foi também pipetado 20 μ L de cada diluição da curva-padrão + 50 μ L da solução do conjugado enzimático estradiol – HRP nos poços destinados à curva. Todo o

processo de pipetagem não ultrapassou 10 minutos. Após, as microplacas foram incubadas durante duas horas à 25°C, lavadas novamente e, então, foram adicionados 100 µL da solução do substrato enzimático em cada poço. As microplacas foram incubadas no escuro até que os poços considerados como zeros chegassem em densidade óptica (OD) entre 0,7 e 1,0; quando foi feita a leitura da absorbância em 490 nm.

No ensaio de ELISA competitivo realizado, a coloração resultante da reação enzima-substrato é inversamente proporcional à concentração do antígeno (i.e., 17β-estradiol), já que esta é resultado da interação competitiva entre o conjugado hormônio-enzima e o 17β-estradiol por um número limitado de anticorpos disponíveis para ligação.

Os dados obtidos foram trabalhados e analisados nos *softwares* Microsoft Excel 2013 e R. Uma ilustração do processo conduzido para a dosagem hormonal é apresentado na Figura 3.

Figura 3. Esquema representativo do ELISA Competitivo para dosagem de 17β- Estradiol



b. Detecção da metalotioneína no fígado dos peixes através do ELISA de Captura

Reagentes necessários

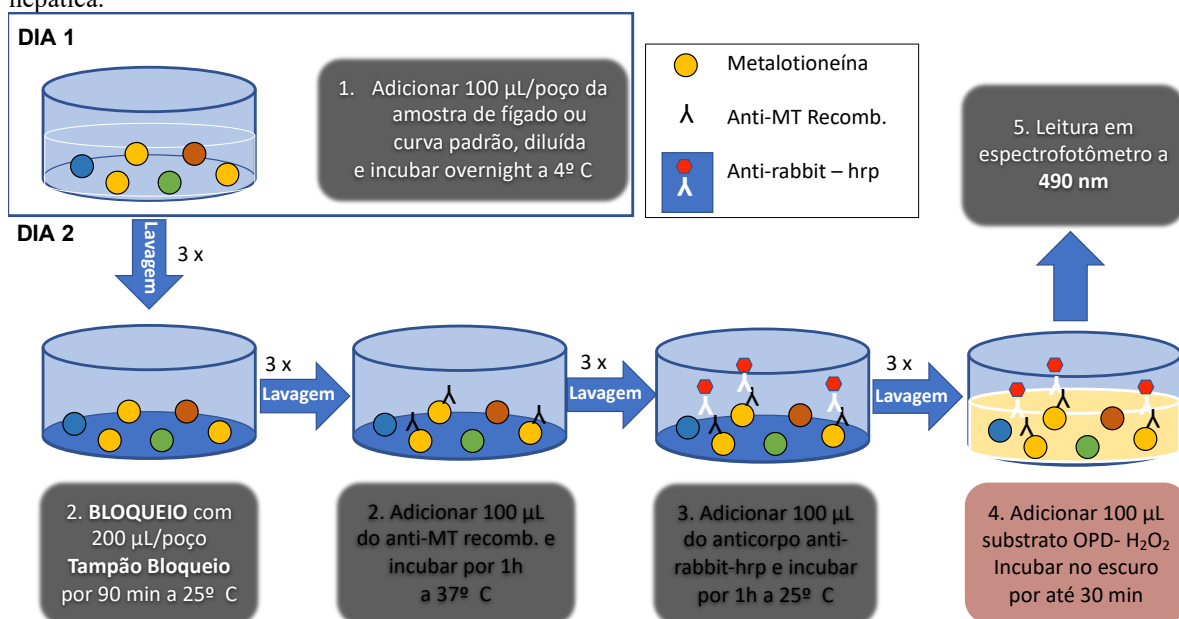
- Tampão Carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6
- Tampão de bloqueio PBS, com BSA a 2%

- Tampão de lavagem PBS-T (Tween-20 a 1 %)
- Substrato OPD (dicloreto de ortofenilenodiamina, Sigma®, 0,5 mg.ml⁻¹ preparado em buffer de citrato 0,05M com pH 5,0 + H₂O₂ 0,015%)
- Solução de parada H₂SO₄ 2M

De forma semelhante a análise da vitelogenina, a detecção da metalotioneína foi realizada através do ensaio de ELISA de captura, onde a microplaca é sensibilizada com as amostras contendo a metalotioneína e os anticorpos anti-MT adicionados se ligam de forma específica à proteína de interesse, os quais são detectados pela ligação de um anticorpo secundário acoplado a uma enzima HRP que reage na presença de um substrato cromógeno (Figura 4). A reação que emite uma coloração em um comprimento de onda de 490 nm é detectada em um espectrofotômetro, é diretamente proporcional à concentração de metalotioneína na amostra.

Para a sensibilização foram adicionados 100 µl das amostras de sobrenadante fígado homogeneizadas (Tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4, PMSF 1mM) diluídas em Tampão Carbonato/bicarbonato e normalizadas a 4mg.ml nas microplacas de 96 poços (Corning) em duplicata, as quais foram incubadas por 16h a 4°C. Para a curva padrão de MT foram adicionadas soluções de Metalotioneína de coelho (Sigma) em concentrações que variaram de 100 a 1,5 ng/ml. No dia seguinte foi realizada a lavagem das placas (3 lavagens de 1 minuto cada) com 200 µl de tampão de lavagem para remoção das moléculas não ligadas. Em seguida foi realizado o bloqueio dos espaços vazios através da adição de 200 µl do tampão de bloqueio permanecendo por 90 minutos, em temperatura ambiente (25°C). Após esse período, as placas foram novamente lavadas, sendo então pipetadas 100 µl da solução do anticorpo de captura (anti-MT recombinante produzido por (Nagamatsu et al., 2021) em uma diluição de 8 µg.ml (o melhor anticorpo e a diluição foram definidos previamente através de diferentes testes) permanecendo a 37°C por 1h. Após o período de incubação e lavagem dos anticorpos não ligados, foram pipetados 100 µL da solução de anticorpo de detecção (anti-rabbit, Bio-rad) a 1:4000, permanecendo por 1h a 25°C. Após, as microplacas foram lavadas novamente e, então, foram adicionados 100 µL da solução do substrato enzimático em cada poço. As microplacas foram incubadas no escuro por até 30 min, quando foi feita a leitura da absorbância em 490 nm em um leitor de microplaca Thermo Scientific® Varioskan Lux.

Figura 4. Esquema representativo do Ensaio de Elisa de Captura para a quantificação da metalotioneína hepática.



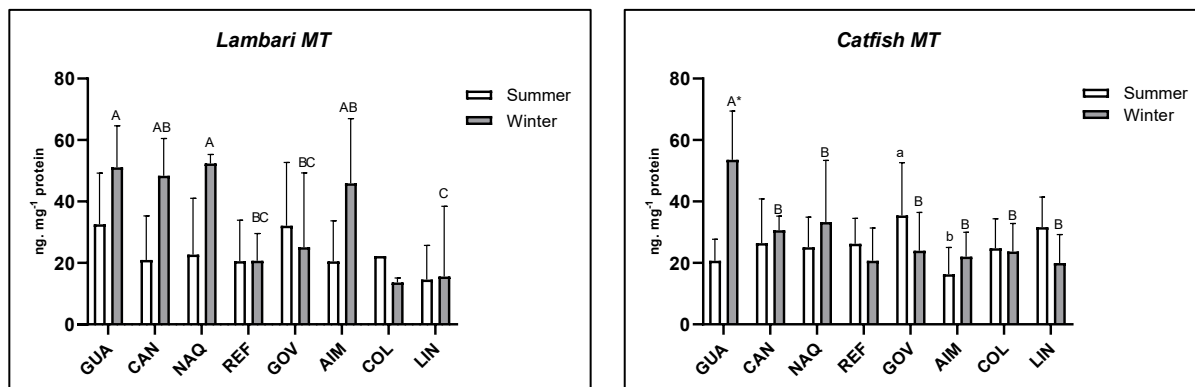
RESULTADOS

Os resultados obtidos pelos ensaios de ELISA para a detecção da vitelogenina e de Estradiol plasmático não foram analisados pois precisam ser agrupados de acordo com o sexo de cada indivíduo, o qual está sendo confirmado pela análise histológica das gônadas, a qual se encontra em fase final de conclusão. Está prevista a finalização da análise até o final de Outubro, para que seja possível concluir a escrita do artigo até Dezembro a Janeiro de 2022.

Por outro lado, a análise da Metalotioneína foi capaz de demonstrar, de forma geral, para ambos grupos de peixes, uma maior expressão nos peixes do Alto Rio Doce, principalmente em GUA, coletados no inverno. Este resultado era esperado, uma vez que

representa o local de maior ocorrência de contaminantes inorgânicos capazes de induzir sua expressão.

Figura 3. Detecção da expressão da metalotioneína em peixes do Rio Doce através do Ensaio de ELISA de Captura.



O ensaio de ELISA de captura demonstrou-se eficaz para a detecção da expressão da metalotioneína no fígado dos peixes do Rio Doce. A técnica de Viarengo et al., (1997), inicialmente proposta no trabalho, apresenta menor sensibilidade e principalmente especificidade para detecção da Metalotioneína, por quantificar o conteúdo de cisteínas, as quais estimam uma quantidade aproximada da metalotioneína. Por outro lado os imunoenaios, como o ELISA, são capazes de detectar baixos níveis de MT além de apresentarem melhor efetividade para detecção desta proteína (Chu et al., 2006). Porém, para realizar este ensaio foi necessário obter um anticorpo que demonstrasse afinidade e especificidade pela molécula a ser analisada. Além disso foi necessário padronizar o teste através do teste de diferentes diluições de anticorpo e amostras para otimização dos resultados obtidos.

4. Análises Histopatológicas

2.1 Fígado

Apesar de não ter sido finalizado o cálculo dos índices histopatológicos para interpretação dos resultados obtidos, nas Figuras 4 e 5 são ilustradas imagens de algumas amostras de fígado de ambas as espécies, coletados no verão e no inverno. Apenas restam serem analisadas algumas réplicas de bagres do verão pela aluna Kaori Onishi, de Iniciação Científica, a qual deve concluir até final de Outubro de 2021.

Figura 4. Secções histológicas do fígado de lambaris coletados no Rio Doce demonstrando diferentes alterações histopatológicas.

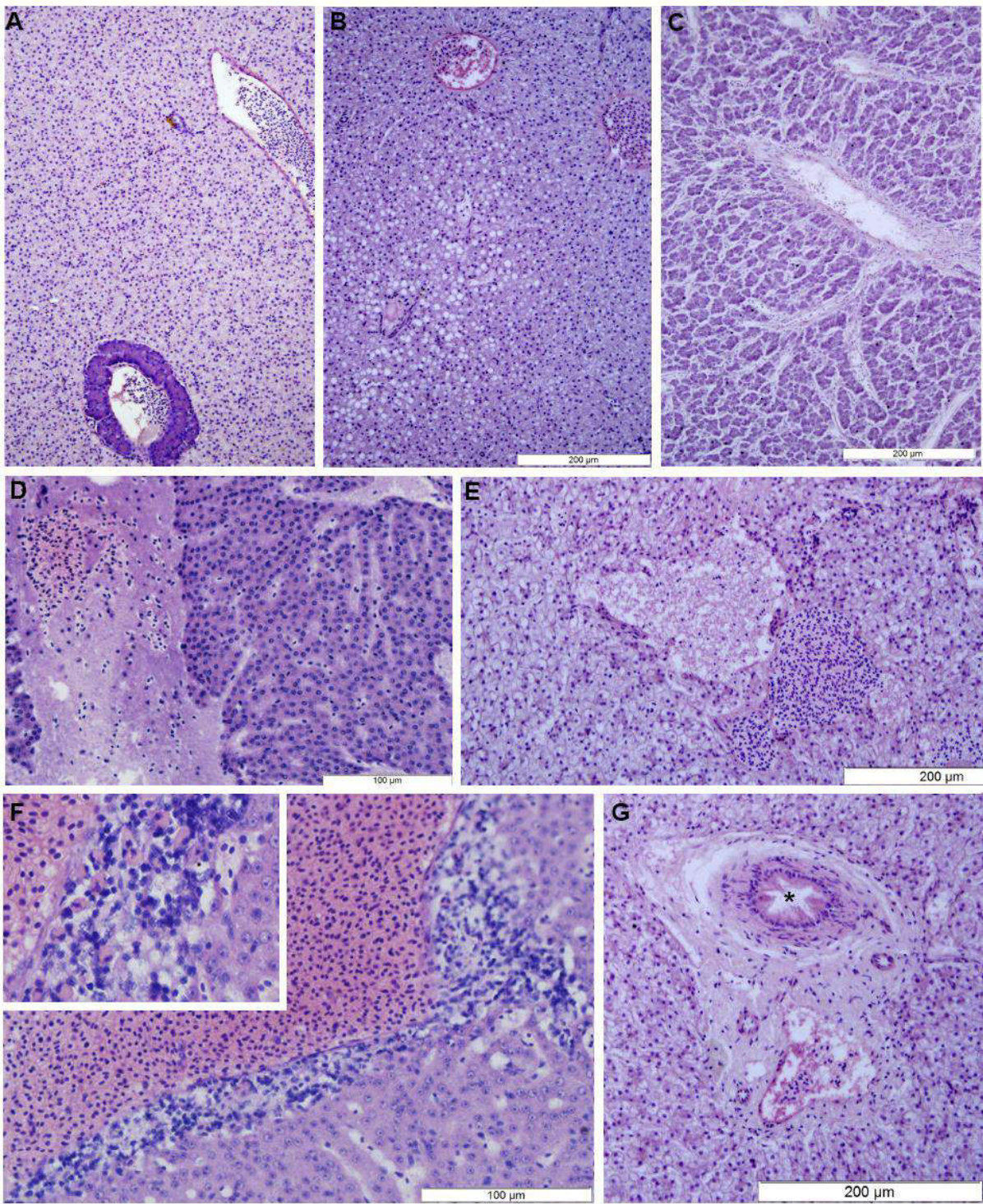
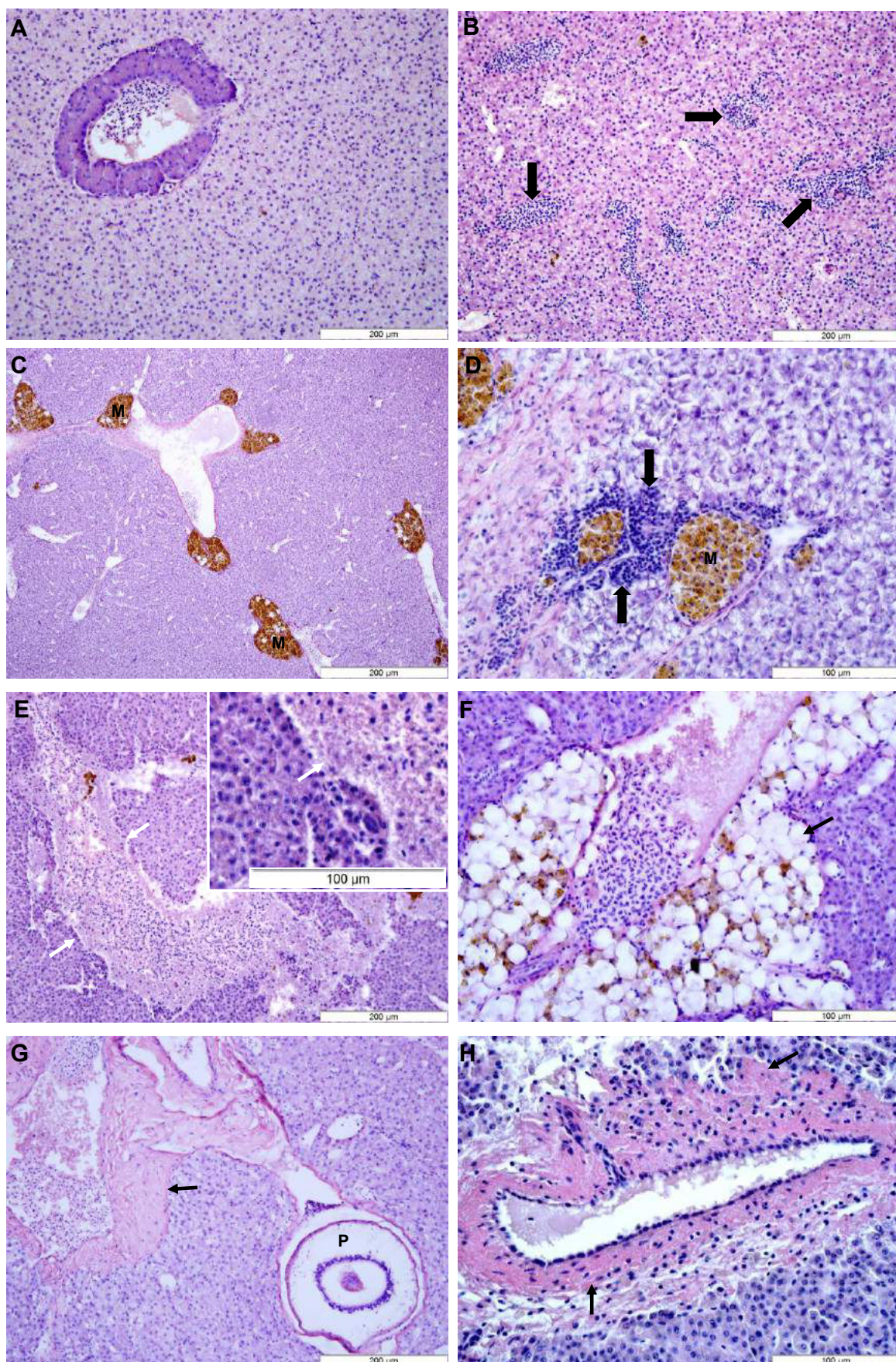


Figura 4. Secções histológicas do fígado de bagres coletados no Rio Doce demonstrando diferentes alterações histopatológicas.



Referências

- Chu, M. M., Guo, Z. Q., Muto, N., Itoh, N., Tanaka, K., & Ren, H. W. (2006). Development of ELISA for metallothionein-II allows determination of heavy metal pollution of fresh water. *Frontiers in Bioscience*, 11(SUPPL. 1), 2113–2122. <https://doi.org/10.2741/1954>
- Moura Costa, D. D., Bozza, D. A., Rizzo, L. E., Garcia, J., Costa, M. D. M., & de Oliveira Ribeiro, C. A. (2016). Characterization, specificity and sensibility of produced anti-Rhamdia quelen vitellogenin in Brazilian fish species. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0252-0>
- Nagamatsu, P. C., Vargas, D. Á. R., Prodocimo, M. M., Opuskevitch, I., Ferreira, F. C. A. S., Zanchin, N., de Oliveira Ribeiro, C. A., & de Souza, C. (2021). Synthetic fish metallothionein design as a potential tool for monitoring toxic metals in water. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(8), 9517–9528. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11427-2>
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1), 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

ANEXO II - Publicações resultantes e não resultantes do auxílio da FAPESP, referentes a todos os períodos

Artigos publicados resultantes do auxílio da FAPESP

1. *From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. Science of the Total Environment* 846, 157332, 2022.
Yamamoto, Flávia Yoshie, Souza, A.T.C., Paula, V. de C.S. de, Beverari, I., Garcia, J.R.E., Padial, A.A., de Souza Abessa, D.M.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>
2. *Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster. Data in Brief* 45, 108715, 2022.
Yamamoto, F.Y., Pauly, G.E., Nascimento, L.S., Fernandes, G.M., Santos, M.P., Kim, B.S.M., Carvalho, M.U., Figueira, R.C.L., Cavalcante, R.M., Grassi, M.T., Abessa, D.M.S.
<https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108715>
3. *Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster. Journal of Hazardous Materials Advances* 9, 100250, 2023.
Yamamoto, F.Y., Pauly, G.F.E., Nascimento, L.S., Fernandes, G.M., Santos, M.P., Figueira, R.C.L., Cavalcante, R.M., Grassi, M.T., Abessa, D.M.S.
<https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2023.100250>
4. *Earlier biomarkers in fish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce River Basin. Environmental Pollution*, 329, 121720, 2023.
Yamamoto, F.Y., Onishi, K., Ralha, T. R., Silva, L.F.O., Deda, B. Pessali, T.Y. C., Souza, C., Oliveira Ribeiro., C.A., Abessa, D.M.S.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121720>
5. *Linking MS1 and MS2 signals in positive and negative modes of LC-HRMS in untargeted metabolomics using the ROIMCR approach. Analytical and Bionalytical Chemistry*, 415(25):6213-6225, 2023.
Flávia Yoshie Yamamoto, Carlos Pérez-López, Ana Lópes Antia, Silvia Lacorte, Denis Moledo de Souza Abessa, Romà Tauler
<https://doi.org/10.1007/s00216-023-04893-3>

Artigos publicados em co-autoraria:

1. *Ecotoxicity of losartan potassium in aquatic organisms of different trophic levels*. Reque, R., Carneiro, R. D., Yamamoto, F. Y., Ramsdorf, W. A., Martins, L. R., Guiloski, I. C., & de Freitas, A. M. (2021). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87, 103727.
<https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103727>
2. *Levels, source appointment, and ecological risk of petroleum hydrocarbons in tropical coastal ecosystems (northeast Brazil): Baseline for future monitoring programmes of an oil spill area*.
Fernandes, G. M., Martins, D. A., dos Santos, R. P., de Santiago, I. S., Nascimento, L. S., Oliveira, A. H. B., Yamamoto, F. Y., & Cavalcante, R. M. (2022). *Environmental Pollution*, 296(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118709>
3. *Acute toxicity characterization of organic UV-filters and chronic exposure revealing multigenerational effects in DAPHNIA MAGNA. Ecotoxicology*, 31(9), 1413–1425.
<https://doi.org/10.1007/S10646-022-02598-4/FIGURES/1>
de Paula, V. de C. S., Gomes, M. F., Martins, L. R. R., Yamamoto, F. Y., & de Freitas, A. M. (2022).

4. *Sublethal effects of the herbicides atrazine and glyphosate at environmentally relevant concentrations on South American catfish (Rhamdia quelen) embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 98, 104057.*
Bordin, E. R., Yamamoto, F. Y., Mannes, Y., Munhoz, R. C., Muelbert, J. R. E., de Freitas, A. M., Cestari, M. M., & Ramsdorf, W. A. (2023).
<https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2022.104057>
5. *Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (Rhamdia quelen) embryos. **Chemosphere**, 263, 127985.*
Gomes, M. F., de Carvalho Soares de Paula, V., Rocha Martins, L. R., Esquivel Garcia, J. R., Yamamoto, F. Y., & Martins de Freitas, A. (2021).
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127985>

Sem o reconhecimento da bolsa FAPESP

1. *Science Policy Report: A new vision of sustainable management in mining and post-mining landscapes, 2019. ISBN: 978-3-8047-4026-6*



From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River

Flávia Yoshie Yamamoto ^{a,*}, Angie Thaisa Costa Souza ^b, Vinicius de Carvalho Soares de Paula ^c, Isabella Beverari ^a, Juan Ramon Esquivel Garcia ^{d,1}, André Andian Padial ^{b,e}, Denis Moledo de Souza Abessa ^a

^a Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil

^b Graduation Program in Ecology and Conservation, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^c Department of Chemistry and Biology, Federal University of Technology-Paraná, Curitiba, Brazil

^d Panama Fish Farm, Paulo Lopes, Brazil

^e Analyses and Synthesis in Biodiversity Lab, Botany Department, Federal University Curitiba, Brazil

HIGHLIGHTS

- Fish embryos exposed to elutriates of the Doce River showed sublethal effects.
- Higher deformities rates indicated significant impacts on population densities.
- Inorganic pollutants from mining activities were correlated to major toxic responses.
- Survival rate per se may underestimate the toxicity of pollutants in the Doce River.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Guest Editor: Rosa Freitas

Keywords:

Mining activities
Sediments
Toxicity test
Biomarkers
Modeling
Sublethal effects

ABSTRACT

Sediments represent a major sink and also a main source of contaminants to aquatic environments. An environmental disaster from a mining dam breakage in 2015 in South-East Brazil re-suspended complex mixtures of chemicals deposited in the sediment, spreading contaminants along the Doce River Basin (DRB) major river course. While high levels of contaminants in sediment were well described, toxicological effects in aquatic organisms were poorly investigated. Thus, the effects of these potentially toxic chemicals were assessed in the present study through different endpoints (biochemical to populational levels) in fish embryos of the South-American silver catfish exposed to elutriates from different sites of the DRB. Despite no significant mortality observed, our results showed that exposure to the elutriates, especially those from the closest site to the dam collapse, caused higher deformities rates and DNA damage in the fish embryos than in the control group. Multivariate analysis showed that these sublethal effects may be related to the high levels of metals introduced by mining activities, compromising long-term survival and reproduction success. In addition, it was possible to observe the influence of other sources of pollutants along the river. According to our data, the mathematical model simulated a significant impact on the population density at longer-term exposure, for the sites that showed the most prominent toxicity responses. The fish embryo toxicity test proved to be an effective

* Corresponding author at: Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Praça Infante Dom Henrique, s/n - Parque Bitaru, SP 11330-900, Brazil.

E-mail addresses: fla_yama@hotmail.com (F.Y. Yamamoto), panama@pisciculturapanama.com.br (J.R.E. Garcia), aapadial@ufpr.br (A.A. Padial), denis.abessa@unesp.br (D.M. de Souza Abessa).

¹ In memory.



Data Article

Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster



F.Y. Yamamoto^{a,1,*}, G.E. Pauly^{a,1}, L.S. Nascimento^{b,2},
G.M. Fernandes^{b,2}, M.P. Santos^{c,3}, B.S.M. Kim^{d,4}, M.U. Carvalho^{a,1},
R.C.L. Figueira^{d,4}, R.M. Cavalcante^{b,2}, M.T. Grassi^{c,3}, D.M.S. Abessa^{a,1}

^a Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil

^b Marine Science Institute, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Chemistry Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^d Oceanographic Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 October 2022

Revised 19 October 2022

Accepted 28 October 2022

Dataset link: [Chemical datasets of environmental samples \(2019\) from the Doce River Basin, Brazil \(Original data\)](#)

Keywords:

Metals

PAHs

Brazil

Contamination

Iron tailing

ABSTRACT

Chemical datasets describing the occurrence of both inorganic and organic contaminants along the Doce River Basin (DRB) could provide a better understanding of the potential impacts of a major mining dam collapse disaster combined to additional chronic sources of contamination. This data article presents datasets of main contaminants detected in the water and sediments sampled four years after the mining dam collapse in the DRB. A summary table of data obtained in the literature is also provided to allow a comparison of the variation of chemicals before, right after in 2015/2016 and after the event (current data). In addition, there are also provided physical-chemical parameters of water and sediments of different sampling sites, which could support the investigation of chemicals distribution. For this purpose, triplicate samples

DOI of original article: [10.1016/j.scitotenv.2022.157332](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332)

* Corresponding author:

E-mail address: f.yamamoto@unesp.br (F.Y. Yamamoto).

¹ Full address: Praça Infante Dom Henrique, s/n - Parque Bitaru, SP, 11330-900, Brazil

² Full address: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, Fortaleza - CE, 60165-081, Brazil

³ Full address: Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100 - Jardim das Américas, Curitiba - PR, 81530-000, Brazil

⁴ Full address: Praça Oceanográfico, 191 - Vila Universitária, São Paulo - SP, 05508-120, Brazil

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108715>

2352-3409/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

of water and sediment were obtained in 8 sampling sites along the DRB during wet and dry seasons of 2019, totaling 48 samples of each environmental matrix. The sampling sites were strategically selected according to their different main sources of pollution along the river. Concentrations of trace elements and organic contaminants (polycyclic aromatic hydrocarbons, and pyrethroids) were determined in samples of water and sediments by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and gas chromatography - mass spectrometry GC-MS, respectively. Main data obtained in the literature consisted in published reports from environmental agencies (IGAM) and private companies (RENOVA) as well as journal articles. The datasets provided may be useful to the stakeholders, which include scientific community, authorities and public agencies, and private companies interested to understand the impacts of the contaminants introduced along the River Basin four years after the environmental disaster.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc.
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Specifications Table

Subject	Environmental Sciences - Pollution
Specific subject area	Environmental contaminants - Detection and quantification of inorganic and organic contaminants in field samples of water and sediment by analytical chemistry.
Type of data	Tables
How the data were acquired	Physical-chemical parameters of water Water – Data available in the literature from RENOVA (https://www.fundacaorenova.org/arquivos-e-relatorios) and IGAM websites (http://www.igam.mg.gov.br/monitoramento-da-qualidade-das-aguas2/monitoramento-da-qualidade-das-aguas-superficiais-do-rio-doce-no-estado-de-minas-gerais). Sediment properties Sediment – Data generated from sediment samples obtained from the Doce River (MG/ES, Brazil). The analysis of composition and grain size distribution of sediment was performed following the wet and dry sieving method. The quantity of Organic Matter (OM) was determined through the method of wet organic matter oxidation. Chemical analyses Inorganic chemicals Data were acquired by an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) Organic chemicals Data were acquired by GC-MS and HPLC-DAD
Data format	Raw Analyzed
Description of data collection	Data was generated from the analysis of samples of water and sediment obtained in two field surveys of the Doce River, located in Southeast Brazil, during wet and dry seasons of 2019. In each survey, eight sampling sites were established across the DRB, and three replicates of water and sediment samples were collected, in both wet and dry seasons.
Data source location	For Tables 3-9 in Chemical data folder and the Raw data folder: 1. Institution: Institute of Biosciences, São Paulo State University 2. City/Town/Region: São Vicente, São Paulo 3. Country: Brazil 4. Latitude and longitude (and GPS coordinates, if possible) for collected samples/data:

(continued on next page)

	1. Gualaxo do Norte (Mariana, MG) – 20°16′44.9″S 43°25′50.2″W 2. Candonga (Rio Doce, MG) – 20°12′24.1″S 42°52′39.7″W 3. Naque (Naque, MG) – 19°14′37.5″S 42°19′09.1″W 4. Rio Corrente (Periquito, MG) – 19°01′31.0″S 42°09′37.3″W 5. Governador Valadares (Governador Valadares, MG) – 18°51′22.0″S 41°55′49.5″W 6. Aimorés (Aimorés, ES) – 19°30′25.0″S 41°00′53.5″W 7. Colatina (Colatina, ES) – 19°30′51.8″S 40°44′21.7″W 8. Linhares (Linhares, ES) – 19°24′30.2″S 40°02′47.4″W The data of physical-chemical parameters of water were obtained in the literature from: six weekly reports for the wet season and three monthly reports for the dry season published by RENOVA (Table 1, Chemical data folder); and for IGAM (Table 2, Chemical data folder) data, it was used four reports from wet and four for the dry seasons of 2019. The reported data of inorganics concentrations detected in water and sediments by different previous studies, were searched in the PubMed database, and their references are described in the tables S1 and S2 (Review of literature data folder).
Data accessibility	Repository name: Mendeley Data [1] Chemical datasets of environmental samples (2019) from the Doce River Basin, Brazil Data identification number: 10.17632/sf2h83t8v3.4 Direct URL to data: https://data.mendeley.com/datasets/sf2h83t8v3/4
Related research article	<i>Published in Science of the total Environment</i> -Yamamoto, F.Y., Costa Souza, A.T., Paula, V.C.S., Beverari, I., Garcia, J.R.Q., Padial, A.A., Abessa, D.M.S, 2022. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River., <i>Sci. Tot. Env.</i> https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332

Value of the Data

- Relevant datasets are provided for screening assessment of major inorganic and organic contaminants occurring along the Doce River basin, and their distribution, three to four years after the mining dam collapse disaster
- Data exploration may be useful to distinguish the impacts from multiple sources of pollutants present along the river that have been affecting the river basin before and after the event, and thus better clarifying the distribution of these contaminants four years after the event.
- The datasets are relevant for performing a more appropriate environmental diagnostic to better predict further ecological and human risks of exposure, including the cumulative effects due to the disaster and the contribution of other pollution sources.
- The data will be useful for the assessment of public authorities (environmental agencies), riverine communities, private companies affected by the mining dam disaster, as well as scientific community, which are concerned by the impacts of the mining dam rupture and are still investigating such impacts.
- The data can be further explored by the application of environmental diagnostic indexes and multiple statistical tools to evidence the major contaminants of concern, the most impacted regions and identify the main sources of pollution (causes) that are affecting the local water quality.
- Chemical data can be associated and integrated with biological data to understand potential impacts of these chemicals in exposed organisms [2]. Finally, these data can be used in comparisons focusing the contamination levels before and after the dam rupture.

1. Data Description

Raw data folder:

- **Grain size Sediment _ UNESP.xlsx** (excel table): Includes initial total weights of each sample, as well as the weight after the sieving process. The tables include the calculation to obtain the percentages of each class of grain size (Clay and silt, very fine sand, fine sand, medium sand, coarse sand, very coarse sand)
- **Inorganics Filtered Water raw data - USP.pdf**: Includes the values of the metal(oids) obtained from the ICP instrument, including standard curve calibrations, blanks and the 48 samples of water of the Doce River (Solutions concentrations, units, Standard Deviation and %RSD).
- **Inorganics filtered water_USP.xls** (excel table): Concentrations of metal(loid)s (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Sc, Sr, Ti, V, Zn) and their respective Relative Standard Deviation (%RSD) determined by ICP, in 48 water samples (mg.L^{-1}) of the Doce River Basin. Maximum, minimum, median and average values for each variable considering all samples are shown in the bottom of the table.
- **Inorganics in Sediments - USP.xls (excel table)**: Concentrations of metal(loid)s (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sc, Ti, V, Zn) and their respective Relative Standard Deviation (%RSD) determined by ICP, in 48 samples of sediments (mg.L^{-1}) of the Doce River Basin. Maximum, minimum, median and average values for each variable considering all samples are shown in the bottom of the table.
- **Inorganics sediment raw data - USP.pdf**: Includes the values of the metal(oids) obtained from the ICP instrument, including standard curve calibrations, blanks and the 48 samples of sediments of the Doce River (Solutions concentrations, units, Standard Deviation and %RSD).
- **LQ-LD-PAHs - UFC.xlsx** (excel table): Limits of quantification (LQ) and Limits of Detection (LD) for the PAHs measured in water and sediments samples of the Doce River.
- **PAHs sediments.zip**: Folder containing raw data of the chromatograms obtained by the GC-MS for the analysis of PAHs in all sediment samples
- **PAHs Sediments - UFC.xlsx** (excel table): Tables containing peak areas of sediment samples and internal standards, used for the calculation of the concentrations of PAHs in the samples.
- **PAHs water GC-MS.zip**: Folder containing raw data of the chromatograms obtained by the GC-MS for the analysis of PAHs in all filtered water samples
- **PAHs Water- UFC.xlsx** (excel table): Tables containing peak areas of water samples and internal standards, used for the calculation of the concentrations of PAHs in the samples.
- **Pyrethroids - UFC.xlsx** (excel table): Tables containing peak areas of water and sediment samples and internal standards, used for calculation of concentrations of Pyrethroids in the samples.
- **Pyrethroid.zip**: Folder containing raw data of the chromatograms obtained by GC-MS for the analysis of Pyrethroids in filtered water and sediment samples
- **Repeating analysis of Al and Fe after dilution - USP.xls**: Table of repetition of the analysis of Al and Fe after a second dilution factor, since the first measurement exceeded values of the standard curve.
- **Repeating analysis of Al and Fe after dilution.pdf**: Includes the values of the Al and Fe obtained from the ICP instrument, including standard curve calibrations, blanks and the 48 samples of water of the Doce River (Solutions concentrations, units, Standard Deviation and %RSD) after a second dilution factor.
- **Tables - Doce River 2019.docx**: tables containing all raw data in the word document.
- **Total inorganics in water - UFPR.xlsx**: Concentrations of metal(loid)s (Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Ti, V, Zn) and their respective Relative Standard Deviation (%RSD) determined by ICP, in 48 water samples (mg.L^{-1}) of the Doce River Basin. Calculations of the concentrations and limits of quantifications are included in the excel file.

2. Chemical Data (Excel Tables 1-9) Folder

Table 1. Physical-chemical parameters of the water (Chlorophyll a ($\mu\text{g.L}^{-1}$), Cyanobacteria ($\mu\text{g.L}^{-1}$), Conductivity ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) Temperature ($^{\circ}\text{C}$) Turbidity (UNT), Dissolved O_2 (mg.L^{-1}) pH, Precipitation. (mm)) obtained from RENOVA, described for six different sites (GUA, CAN, NAQ, GOV, AIM, REG) along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 2. Physical-chemical parameters of water (dissolved Al, As, Cd, Pb, dissolved Cu, Cr, dissolved Fe, Mn, Hg, Ni, NO_3 , Zn, total Coliforms, Chlorophyll a ($\mu\text{g.L}^{-1}$), Cyanobacteria ($\mu\text{g.L}^{-1}$), Conductivity ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) Temperature ($^{\circ}\text{C}$) Turbidity (UNT), Dissolved O_2 (mg.L^{-1}) pH) obtained from IGAM, described for five different sites (GUA, CAN, NAQ, GOV, AIM) along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 3. Grain size distribution of sediment samples surveyed along the DRB during wet and dry seasons of 2019 determined by electromagnetic sieve shaker used to separate into 6 different sandy fractions, according to Wentworth (1922) classification. Organic Matter content of sediment samples, surveyed along the DRB during wet and dry seasons of 2019, determined through the method of wet organic matter oxidation according to [3], modified by [4].

Table 4. Concentrations of metal(loid)s (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Sc, Sr, Ti, V, Zn) determined in acidified filtered water (mg.L^{-1}), according to Procedure 1, sampled in eight locations along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 5. Concentrations of elements (Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Ti, V, Zn) determined in centrifuged water samples (mg.L^{-1}), according to Procedure 2, obtained in eight locations along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 6. Concentrations of metal(loid)s (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sc, Ti, V, Zn) determined in sediments ($\mu\text{g.g}^{-1}$) sampled in eight locations along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 7. The Concentrations of the sixteen High Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Naphtalene (NAP), acenaphthylene (ACY), acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Fltr), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chry), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), benzo[g,h,i]perylene (BghiP), indeno[1,2,3-c,d]pyrene (Ind), and dibenz[a,h]anthracene (DahA) and other 5 non-priority PAH: 1-Methylnaphthalene (1-MNaf), 2-Methylnaphthalene (2-MNaf), Dibenzothiophene (DBT), benzo[e]pyrene (BeP), Perylene (Per) quantified in the water ($\mu\text{g.L}^{-1}$) of the eight sampling sites along the DRB during the wet and dry seasons of 2019.

Table 8. The Concentrations of the sixteen High Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Naphtalene (NAP), acenaphthylene (ACY), acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Fltr), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chry), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), benzo[g,h,i]perylene (BghiP), indeno[1,2,3-c,d]pyrene (Ind), and dibenz[a,h]anthracene (DahA) and other 5 non-priority PAH: 1-Methylnaphthalene (1-MNaf), 2-Methylnaphthalene (2-MNaf), Dibenzothiophene (DBT), benzo[e]pyrene (BeP), Perylene (Per) detected in sediments ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) of the eight sampling sites along the the DRB during the wet and dry seasons of 2019.

Table 9. The Concentrations of Pyrethroids: Permethrin (PER), Cyfluthrin (CYF), Cypermethrin (CYP), Deltamethrin (DEL), Bifenthrin (BIF) and summation of total Pyrethroid (ΣPYR) detected in the water ($\mu\text{g.L}^{-1}$) and sediment ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) of the eight sampling sites along the the DRB during the wet and dry seasons of 2019.

3. Review of Literature Data

Table S1 – Water: summarizes the data obtained in the literature by Pubmed database, describing the levels of inorganic chemicals present in the water along different sites of the Doce River Basin before and after the dam rupture event in 2015.

Table S2 – Sediments: summarizes the data obtained in the literature by Pubmed database, describing the levels of inorganic chemicals present in sediments along different sites of the Doce River Basin before and after the dam rupture event in 2015.

Table 1. Physical-chemical parameters of the water obtained from RENOVA, described for six different sites along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 2. Physical-chemical parameters of water obtained from IGAM, described for five different sites along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 3. Granulometry and Organic Matter content of sediment samples surveyed along the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 4. Concentrations of main inorganic chemicals detected in the water (in mg.L⁻¹) of the DRB during wet and dry seasons of 2019, by Procedure 1.

Table 5. Concentrations of main inorganic chemicals detected in the water (in mg.L⁻¹) of the DRB during wet and dry seasons of 2019, by Procedure 2.

Table 6. Concentrations of major trace elements detected in sediments (μg.g⁻¹) of the DRB during the wet and dry seasons of 2019

Table 7. Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons detected in the water (μg.L⁻¹) of the DRB during the wet and dry seasons of 2019.

Table 8. Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons detected in sediments (μg.kg⁻¹) of the DRB during wet and dry seasons of 2019.

Table 9. The Concentrations of Pyrethroids detected in the water (μg.L⁻¹) and sediment (μg.kg⁻¹) of the eight sampling sites along the the DRB during the wet and dry seasons of 2019.

Table S1. Table summarizing the data obtained in the literature describing the levels of inorganic chemicals present in the water along the Doce River Basin before and after the dam rupture event in 2015.

Table S2. Table summarizing the data obtained in the literature describing the levels of inorganic chemicals present in sediments along the Doce River Basin before and after the dam rupture event in 2015.

4. Experimental Design, Materials and Methods

4.1. Materials and methods

The datasets contain concentrations of inorganic and organic contaminants determined in water and sediment samples obtained in 8 sampling sites along the Doce River, during wet and dry seasons of 2019. The eight sampling sites represent each of the three regions of the DRB (Yamamoto et al. 2022): Upper, Middle (both in the Minas Gerais state) and Lower Regions (Espírito Santo state), which are under the influence of different human activities [5].

Description of the sampling sites according to Yamamoto et al., (2022):

Region	Sampling sites	Description of Human activities along the DRB [5]
Upper DR	1 - Gualaxo do Norte River(GUA), Mariana, MG	Intense mining activity, with iron and artisanal gold extraction. Closest site to the Fundão dam collapse, in Mariana municipality, MG. Hydropower Plant Reservoir that retained approximately 10 million m ³ of mining tailing introduced into Doce River.
	2- Candonga (CAN), HPP Reservoir, Rio Doce, MG	
Middle DR	3 - Naque, MG (NAQ)	Downstream site of steel mill industries and a large-scale pulp mill industry (CENIBRA)
	4 - Reference site (REF), Corrente River, Periquito, MG	Doce River affluent selected as Reference site. The river cross a region within a restrictive Environmental Protected Area (Corrente River State Park), and was not affected by the mud wave.
	5 - Governador Valadares (GOV), MG	Largest urban center of Doce River basin (245 thousand hab.), with non-treated wastewater release

(continued on next page)

Region	Sampling sites	Description of Human activities along the DRB [5]
Low DR	6 - Aimorés, ES (AIM)	Crops (mainly coffee) and livestock
	7 - Colatina, ES (COL)	Crops and urban impact (Colatina district)
	8 - Linhares, ES (LIN)	Crops and urban impact (Linhares district)

The seasonal variation was also assessed in two sampling surveys performed during the wet season (Jan – Feb) and dry season (Jul-Aug) of 2019. The water samples (3 L per sampling site and season, divided in three field replicates of 1 L each) were directly collected with the own bottle for storage, at a depth approximately below 30 cm from the surface, in three different sites of each location. For the analysis of inorganic contaminants, the water samples (1 L per sample in triplicate) were acidified with HNO_3 0.5% within 24 h after sampling, and stored in new polypropylene bottles at 4° C, in the absence of light. For the organics, the water was stored in new amber glass bottles, and kept at 4° C in the absence of light. The surface sediment samples were obtained with plastic shovels, more than 5 meters distant from the riverbank and in a maximum depth of 10 cm, and stored in white polyethylene bottles for inorganic analysis, and in aluminum containers in the case of aliquots for organic compounds analyses, kept at -20° C until analysis. Samples of approximately 1 kg were collected in three different sites for each location along the Doce River (total of 3 kg per location, for triplicate analysis).

4.2. Physicochemical parameters of water

Data of physicochemical parameters were obtained by weekly and monthly reports available in the literature, from RENOVA Foundation and from the environmental agency IGAM, for the same periods of the field surveys of Wet (01/14/2019 to 01/23/2019 for sampling sites in MG state and 02/10/2019 to 02/18/2019 in ES state) and Dry (07/10/2019 to 07/19/2019 for sampling sites in MG state and 12/08/2019 to 18/08/2019 in ES state) of 2019. A total of six weekly reports for the wet season and three-monthly reports for the dry season published by RENOVA described Chlorophyll a (mg/L), Cyanobacteria (mg/L), Conductivity (mS/cm), temperature (°C), turbidity (NTU), Dissolved oxygen (mg/L), pH and average precipitation (mm) in water. The search for physicochemical data considered six sampling sites described in the reports, which could correspond spatially to at least six out of the eight sites described in the field surveys. Regarding the IGAM data, four reports from Wet and four for the Dry described the levels of: (dissolved Al, As, Cd, Pb, dissolved Cu, Cr, dissolved Fe, Mn, Hg, Ni, NO_3 , Zn, total Coliforms, Chlorophyll a ($\mu\text{g.L}^{-1}$), Cyanobacteria ($\mu\text{g.L}^{-1}$), Conductivity ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) Temperature (°C) Turbidity (UNT), Dissolved O_2 (mg.L^{-1}) pH) at 5 different sites (GUA, CAN, NAQ, GOV, AIM) across the DRB. The quali-quantitative parameters of the water (QQPM) were obtained through an automatic monitoring of fixed equipments distributed along the Doce River Basin.

References for database for physicochemical parameters:

Report	Repository link
RENOVA Database	
1 01/14/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/01/boletim-semanal-periodo-chuvoso_14.01.2019.pdf
2 01/21/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/01/boletim-semanal21.pdf
3 01/28/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/01/boletim-semanal-periodo-chuvoso_28.01.2019.pdf
4 02/04/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/02/boletim-semanal-periodo-chuvoso_04.02.2019.pdf
5 02/11/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/02/boletim-semanal-periodo-chuvoso_11.02.19.pdf
6 02/18/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/02/boletim-semanal-periodo-chuvoso_18.02.2019.pdf

(continued on next page)

Report	Repository link
7 02/25/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/02/boletim-semanal-periodo-chuvoso_25.02.2019.pdf
8 07/03/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/07/boletim-mensal-periodo-seco_junho_2019-1.pdf
9 08/06/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/08/boletim-mensal-periodo-seco_julho_2019.pdf
10 09/09/2019	https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2019/09/boletim-mensal-periodo-seco_agosto_2019.pdf
IGAM database	
1 2010-2019	http://www.igam.mg.gov.br/component/content/article/16-duvidas/2493-tabelas-de-resultados

4.3. Physicochemical parameters of the sediment samples

4.3.1. Sediment grain size distribution

The composition and grain size distribution of the sediment was analyzed following the wet and dry sieving method (CETESB, L6.160). A fraction of the lyophilized sediment sample was weighed (100– 120 g per sample) and wet sieved (distilled water) in a 0.062 mm mesh to remove muddy fraction, being subsequently dried for 2 days at 60°C. Then, the material was sieved for 20 min in an electromagnetic sieve shaker (Bertel), using a 6-piece sieve for 20 minutes, to separate the sandy fractions. The fraction removed from each sieve was weighed and recorded, and the contents of sand, silt and clay were determined, according to the classification of [6].

4.3.2. Organic matter

The quantity of Organic Matter (OM) was determined through the method of wet organic matter oxidation [4]. One gram of each lyophilized sediment was oxidized with 10 mL of K₂Cr₂O₇ 1N within 20 mL of H₂SO₄ PA. After light agitation and resting for 30 min, 200 mL of distilled water, 10 mL of orthophosphoric acid PA and 1 mL of 1% diphenylamine were added. The excess of remaining dichromate from the oxidation was titrated with 0.5N ammoniacal ferrous sulfate (AFS) solution and the organic matter content was calculated based on the volume of AFS added in the titration. The same procedure was performed without sediment sample to obtain a blank value for comparison with the samples.

4.4. Chemical analysis

4.4.1. Procedure 1 - inorganics in water

The concentrations of the inorganic chemicals in the water were determined by two different procedures. For the procedure 1, performed by the IO-USP Institution, the samples were filtered with PTFE membrane of 0.45 μm pore size (Merck Millipore™), and analyzed in triplicate for determination of Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Sc, Sr, Ti, V, Zn. The results were expressed as mg L⁻¹ and compared to CONAMA Resolution 357/2005, according to its respective class of water (for Doce River, Class II). The quantification was performed in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) according to USEPA 6020 (2014).

For the procedure 2, performed by the UFPR Institution, the 48 river water samples were centrifuged for 10 minutes at 3500 rpm to precipitate the suspended material. Subsequently, the solutions were analyzed directly by conventional nebulization in ICP OES for elemental quantification of Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Ti, V, Zn. For quantification of Hg was used the hydride generation technique coupled to the ICP OES.

For instrumental determination it was used an Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP OES, Thermo Scientific, model iCAP 6500) with axial view, software Thermo

Table 10

ICP OES instrumental parameters for measuring inorganic contaminants in the water.

<i>Conventional Nebulization</i>		
Radiofrequency		40 MHz
Radiofrequency potential(RF)		1.15 kW
Plasma gas flow		12.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow		0.5 L min ⁻¹
Carrier gas flow		0.7 L min ⁻¹
Stabilization time		20 s
Replicates		2
Torch		Quartz, axial view
Analytical lines	Al	396.152 nm
	As	193.696 nm
	Cd	228.802 nm
	Co	228.616 nm
	Cr	267.716 nm
	Cu	324.754 nm
	Fe	259.940 nm
	K	766.490 nm
	Li	670.784 nm
	Mg	279.553 nm
	Mn	257.995 nm
	Na	589.592 nm
	Ni	221.647 nm
	Pb	220.353 nm
	Ti	323.452 nm
	V	309.311 nm
	Zn	213.856 nm
<i>Hydride generation system</i>		
Sample flow		3.0 mL min ⁻¹
NaBH ₄ flow		3.0 mL min ⁻¹
HCl flow		3.0 mL min ⁻¹
NaBH ₄ concentration		1.0% m v ⁻¹ (0.4% m v ⁻¹ of NaOH)
HCl concentration		6.0 mol L ⁻¹
Analytical line	Hg	184.950 nm

iTEVA - Control Centre version 2.8.0.97, K-TYPE Concentric Nebulizer and Cyclonic Spray chamber aqueous. PVC peristaltic pump tubing Orange/White, 0.64 mm i.d. (Meinhard Gals Products, USA) were used for the transport of the solutions. For hydride generation technique it was used a lab-made equipment with PVC peristaltic pump tubing White/White, 1.016 mm i.d. for transport of the sample solutions and PVC peristaltic pump tubing Black/Black, 0.76 mm i. d. for transport of the acid and reductant solutions. The instrumental parameters are shown in Table 10.

The values of range concentration of analytical curves and the limits of quantification (LOQ) followed the values established by CONAMA Resolution 357/2005 (Doce River, Class II). The analytical curves were constructed from a 1000 mg L⁻¹ multielement standard solution (AccuStar, New Have, USA) containing Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, and Zn. For the other elements, standard single-element solutions of 1000 mg L⁻¹ and for Hg 100 mg L⁻¹ were used. The concentration ranged from 1.0 to 2000 µg L⁻¹ in 1% (v v⁻¹) HNO₃ concentrated medium for Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb and Zn. For determination of Hg by hydride generation, the concentration range was from 0.1 to 2.0 µg L⁻¹ aqua regia (3HCl:1HNO₃) 10% (v v⁻¹). The curves showed a correlation coefficient above 0.999 for all the elements. The solutions for the generation of hydrides were prepared with NaBH₄ P.A. (Reatec, Brazil), NaOH P.A. (Synth, Brazil), HCl P.A (Reatec, Brazil) previously distilled and HNO₃ (Merck, Germany).

Table 11
Certified value (mg kg⁻¹) and result of mean ± standard deviation (SD), recovery and relative standard deviation (RSD) of SS-2 (n=3) for inorganic chemicals measured by ICP IOS.

Al	9548	10125 ± 679	106	6.9
As	3.36	4 ± 0,5	115	12.2
Cd*	0.91	1.2 ± 0.1	130	5.2
Cr	92.6	102 ± 8	110	7.8
Cu	120	123 ± 5	102	4.3
Fe	23083	23118 ± 785	100	3.0
Ni	25.1	24 ± 1	96	5.0
Pb	244	219 ± 10	90	4.5
Zn	281	289 ± 22	106	7.7

4.4.2. Organic chemicals in water

The organic contaminants (Polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs) in the water were determined according to the method of Solid-Phase Extraction-SPE (Method 3535A) proposed by USEPA (2007), validated by [7] for the PAHs and according to [8] for the Pyrethroids . The compounds were extracted from filtered water samples (PTFE membrane of 0.45 μm pore size, Merck Millipore™) through solid phase extraction with cartridge SPE C18 (Discovery Ò DSC-18 SPE, 0,5g/6 mL) coupled to a vacuum manifold system (Visiprep™). The columns were preconditioned with Miliq water, in a flux of approximately 5 mL.min⁻¹, and the compounds were eluted with 0.5 mL of acetone, 0.5 mL of ethyl acetate, 0.5 mL of hexane and lastly 0.5 mL of a mixture of the three solvents in equal proportions.

The determination of the organic contaminants was performed with a gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010, Shimadzu) in the splitless mode. The analytes of interest were separated in a capillary column DB-5 Agilent J&W (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane) of 30 m x 0.25 mm i.d with 0.25 μm film thickness, with helium (99.999%) as the carrier gas. The initial oven temperature was 60°C, that was maintained for 3 min at a rate of 15°C min⁻¹, after it was increased to 200°C at a rate of 6°C min⁻¹, until reaching the final temperature of 300°C that was maintained for 7 min. For identification of the 21 PAH compounds, the retention time of the analytical standards were used to match with the injected samples, considering the confirmations of the ion mass fragments and the NIST library. Quantification of analytes was performed based on a 5-point calibration curve, using the internal standard method. Accepted linearity was obtained in all calibrations (r²>0.99).

4.5. Sediment

4.5.1. Inorganic chemicals

The trace elements Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Ti, V and Zn were quantified in the whole sediments as triplicate samples for each of the eight sites and sampling season. All glassware was previously washed with 10% nitric acid. Metals were extracted from 1 g of sediment digested in 5 mL of nitric acid 50%, followed by two successive additions of 2.5 mL of HNO₃ PA (Merck) in the digestive block at 95° C. Peroxide hydrogen (6 mL progressively added, for 270 min), HCl PA (5ml for 15 min) and water were added to complete 50 ml of solution. The detection was performed in an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The metal concentrations in the sediment were expressed as μg.g⁻¹ or dry (weighing after dehydration).

To ensure the reliability of the test, an SS-2 certified reference material (EnviroMAT Contaminated Soil, SCP Science) was subjected to the same analytical procedure. The certified values of each analyzed element are presented in Table 11, with recovery data and relative standard deviation. All recoveries were within the values recommended by USEPA (1996) showing accuracy and precision. Detection limits were calculated (m = 1.0 g; v = 50 ml) and with the exception of Cd (0.38 mg kg⁻¹) all results were above.

4.5.2. Total Hg in the sediments

The experimental procedure to determine total Hg in sediment samples was performed according to Santos et al. 2005. Sediment samples were firstly grounded in agate mortar and sieved with a 100 μm stainless steel granulometric sieve. In approximately 30 mg of the sieved sample it was added 1.5 mL of aqua regia ($3\text{HCl}:1\text{HNO}_3$) in 15 mL polypropylene tubes. The mixture was submerged in an ultrasound bath for 30 minutes. After this period, the suspension was incubated for 24 hours with occasional manual agitation and was subjected to another ultrasound for 30 minutes. At the end the volume was adjusted to 15 mL with deionized water. The final concentration of aqua regia in the suspension was 10% v v⁻¹. The procedure was performed in duplicate and analyzed according to the ICP OES conditions described for the Procedure 2.

Blank reagents were included in the analysis system to ensure the absence of contamination in all the samples. The recovery test was performed with the analysis of certified material RS-3 (river sediment) from a round-robin test, the recovery rate was 94% for Hg (Santos, et al. 2005).

4.5.3. Organic chemicals in the sediments

Differently than inorganic analysis, sediments sampled for organic analysis were stored in aluminum containers as composite samples, formed by a mixture of three subsamples, in equal proportions (total of 8 composite samples per season).

The extraction of organic contaminants was carried out according to [9], consisting of the extraction of total organic contaminants followed by clean-up for separation into three fractions with different polarities. All glassware was previously washed with 25% Detertec and rinsed with acetone PA. For each 15 g of lyophilized sediment sample, it was spiked deuterated surrogate standards at final concentrations of 100 ng g⁻¹ (p-terphenyl- d₁₄, purchased from Supelco/Aldrich). The total organic chemicals from the spiked samples of sediment were extracted with a solid-liquid extraction consisting of the addition of a sequence of solvents with decreasing polarity indexes (*P'*): 25 ml of each solvent Acetone, Ethyl acetate, Dichloromethane, Hexane, and the mixture of the four solvents in same proportions, all purchased from MERCK. Samples remained on ultrasound for 20 min for each solvent, followed by centrifugation at 4000 rpm for 15 min. The supernatant was concentrated in a rotary evaporator in a 250 mL flask to a volume of approximately 1 mL.

The clean-up procedure consisted of separating the compounds through chromatographic affinity in an open preparative column (1 $\times$ 50 cm) containing 8.0 g of Silica gel (MERCK), 4.0 g of alumina (MERCK), 0.5 g of Cu (MERCK) and 1.0 g of anhydrous sodium sulfate (VETEC). The elution sequence was based on the increasing range of elutropic strength by adding 40 ml of Hexane (Fraction 1), 60 ml of Hexane: Dichloromethane: Ethyl Acetate (3: 3: 1 - Fraction 2) and 50 ml of Dichloromethane: Methanol (9: 1 - Fraction 3). The extracts were concentrated in a rotary evaporator and stored in amber vials kept at -20° C until analysis. The determination of the 21 PAHs in the sediment extract (Fraction 2) (Table 8) and Pyrethroids (Fraction 3) (Table 9) was performed with a gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) as previously described for the water samples.

4.6. QA/QC

Method blanks were included in the analysis system to ensure the absence of contamination in all the samples. The method blank consists of clean glassware included in each batch under the same processing method than environmental samples. This quality control sample is used for sample concentration correction of environmental samples via background subtraction. Besides instrument blanks (n-hexane) were analyzed to evaluate any instrument noise.

Furthermore, the deuterated surrogate standard with known concentration, was spiked at in the beginning of the extraction and quantified at the end of all the process, to assess the efficiency of the analyses (Cavalcante et al., 2008. The average recovery from our environmental samples was 63% $\pm$ 29%. The values in the Table 8 were not modified by the recovery values.

Ethics Statements

The authors confirm that a consent from RENOVA foundation was obtained for data collected from their website.

CRediT Author Statement

Yamamoto, F.Y.: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation; **Eufrásio, G.:** Methodology, Validation, Investigation; **Nascimento, L.S.:** Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing; **Fernandes, G.M.:** Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing; **Santos, M.P.:** Methodology, Validation, Investigation, Writing – original draft preparation; **Kim, B.S.M.:** Validation, Investigation; **Figueira, R.C.L.:** Validation, Resources; **Cavalcante, R.M.:** Validation, Resources; **Grassi, M.T.:** Validation, Resources; **Abessa, D.M.S.:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Chemical datasets of environmental samples (2019) from the Doce River Basin, Brazil (Original data) (Mendeley Data).

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) by the research grant Process 2016/15229-1 and 2018/23279-4.

Additionally, the authors would like to thank for the kind assistance of the fishermen from the Doce River, José F.S. Abreu (APARD Association) and the RENOVA foundation during the field surveys, as well as the support from the staff of the different laboratories (NEPEA-UNESP, LAQUIMAR-IO, USP, LACOR-UFC, Environmental Chemistry Group-UFPR). We also thank the PhD candidate Larissa Ajala Batista for designing the map of the area of study. DMSA thanks CNPq for the financial support (Grants #311609/2014-7 and #308533/2018-6).

References

- [1] F. Yamamoto, G. Eufrasio, L. Sampaio Nascimento, G. Fernandes, M.P. Santos, B.S.M. Kim, R. Figueira, R. Cavalcante, M. Grassi, D.M.S. Abessa, Chemical datasets of environmental samples (2019) from the Doce River Basin, Brazil, Mendeley Data, V4 (2022). <https://doi.org/10.17632/SF2H83T8V3.4>.
- [2] F.Y. Yamamoto, A.T.C. Souza, V. de C.S. de Paula, I. Beverari, J.R.E. Garcia, A.A. Padial, D.M. de Souza Abessa, From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River, Sci. Total Environ. 846 (2022) 157332, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157332.
- [3] A. Walkley, I.A. Black, An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method, Soil Sci. 37 (1934) 29–38, doi:10.1097/00010694-193401000-00003.
- [4] O.A. Camargo, A.C. Moniz, J.A. Jorge, J.M.A.S. Valadares, in: Methods of chemical, mineralogical and physical analysis of soils in the Instituto Agronômico, Campinas, Instituto Agronômico, 2009, p. 77p. <https://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/arquivos/iacbt106.pdf>.
- [5] A.N. de águas, ANA, Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG, 2015 Brasília - DF https://www.snirh.gov.br/portal/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/encarteriodoce_22_03_2016v2.pdf.

- [6] F.P. Shepard, Nomenclature based on Sand-silt-clay ratios, *J. Sediment Petrol.* 24 (1954) 151–158, doi:[10.1097/00006534-195409000-00011](https://doi.org/10.1097/00006534-195409000-00011).
- [7] R.M. Cavalcante, N.S.M. Filho, R.B. Viana, I.R.N. Oliveira, R.F. Nascimento, E.R. Silveira, G.S.S. Freire, Utilization of solid-phase extraction (SPE) for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental aqueous matrices, *Quimica Nova* 30 (2007) 560–564 http://static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol30No3_560_09-AR06060.pdf.
- [8] W.C. Duaví, A.F. Gama, E.P. Damasceno, L.B. Moreira, V.P.A. Da Silva, R.F. Nascimento, R.M. Cavalcante, Are pesticides only a problem from rural areas? The case of a highly urbanised tropical mangrove (Fortaleza, CE, Brazil), *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (2021), doi:[10.1080/03067319.2021.1946524](https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1946524).
- [9] P.C.V. Morais, A.F. Gama, G.M. Fernandes, A.H.B. Oliveira, M.F.B. Lima, F.R. dos Santos, D.A. Martins, R.F. Nascimento, R.M. Cavalcante, Emerging and Traditional Organic Markers in Areas with Multiple Anthropogenic Activities: Development of an Analytical Protocol and Its Application in Environmental Assessment Studies, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102 (2019) 66–76, doi:[10.1007/s00128-018-2475-5](https://doi.org/10.1007/s00128-018-2475-5).



Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster

F.Y. Yamamoto^{a,*}, G.F.E. Pauly^a, L.S. Nascimento^b, G.M. Fernandes^b, M.P. Santos^c, R.C.L. Figueira^d, R.M. Cavalcante^b, M.T. Grassi^c, D.M.S. Abessa^a

^a Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil

^b Marine Science Institute, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Chemistry Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^d Oceanographic Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Key words:

Trace elements
Organic chemicals
Geochemistry
Complex mixtures
Multivariate analysis

ABSTRACT

High concentrations of hazardous chemicals may be introduced into aquatic ecosystems during episodes of acute and chronic environmental contamination. This study aimed to quantify inorganic and organic contaminants along the Doce River Basin (DRB), evaluate spatial and temporal variations of their concentrations, and their associations with the respective potential anthropogenic sources, considering the cumulative effects of a tailing dam rupture event. Multivariate analysis indicated that higher levels of trace elements in the Upper DRB were related to its proximity to the mining activities in this region, while organic contaminants such as PAHs are probably introduced by industrial effluents and urban centers along the DRB. In addition, seasonal variation showed to be an important factor influencing the distribution of chemicals, with wet season increasing levels of trace elements in the water. Despite the contribution of natural geological features in the Upper DRB, it becomes clearer that intense mineral exploitation for decades, combined with the dam failure disaster are responsible for the increased levels and spread of these inorganic contaminants along the DRB. Furthermore, other sources of organic contaminants contribute to this contamination scenario, resulting in complex mixtures of chemicals and increasing the ecological risks in the region.

Introduction

Episodes of acute and chronic environmental contamination may affect the exposed organisms, causing considerable environmental damage, which can become irreversible. Failures in the implementation and enforcement of environmental legislation aggravate this scenario, allowing or even stimulating the installation and operation of multiple anthropogenic sources of pollution (Fang et al., 1994; Heyes, 2000). As a result, the quality of water has worsened over the last decades, with negative implications for human and environmental health, especially in developing countries, such as Brazil (Agostinho et al., 2005; Azevedo-Santos et al., 2019).

The Doce River Basin (DRB) represents one of the greatest examples of severe environmental contamination by metal(oid)s in the world as a consequence of poor environmental management, including overex-

ploitation by mining activities, lack of planning for land and natural resources uses installation of pollution sources, and failing to accomplish the environmental legislation. The springs of the Upper DRB region have been extensively explored for gold mining for the last three centuries, and more recently for iron exploitation, which has greatly increased the amounts of trace elements released into the environment (Rhodes et al., 2018; A. S. de L. Rodrigues et al., 2014; Varejão et al., 2009).

The mesothermal gold deposits in this area are characterized by naturally high levels of arsenic and other elements, such as Cu, Zn, and Mn, exceeding 40 times the average of As concentrations in non-mineralized iron formations and ranked as the largest geochemical As anomaly in Brazil (Borba et al., 2003; Terezinha Costa et al., 2006). In addition, like in the Amazon basin, the artisanal gold extraction still performed illegally nowadays, has contributed to the release of large quantities of Hg into the DRB and the atmosphere (Rhodes et al., 2018).

* Corresponding author at: Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil. Praça Infante Dom Henrique, s/n - Parque Bitaru, SP, 11330-900. E-mail addresses: fla_yama@hotmail.com (F.Y. Yamamoto), rfigueira@usp.br (R.C.L. Figueira), mtgrassi@ufpr.br (M.T. Grassi), denis.abessa@unesp.br (D.M.S. Abessa).

Following the “Gold Era”, with the exhaustion of gold deposits, iron ore has become the most explored metal in the region by large-scale companies, in the subsequent decades. About 292 million tons of iron are produced per year, making Brazil the second largest producer worldwide (OECD, 2022). In addition to the high levels of As and Hg, Fe anomalies in sediments may be associated with the tailings rich in Fe oxides from the intense iron ore mining in the upper course of the Doce River Basin (A. S. de L. Rodrigues et al., 2013). Finally, manganese is another abundant essential element found in the DRB, with background values ($1770 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) approximately 2.6 fold greater than the average of the earth's crust ($600 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Leão et al., 2019). In fact, a geochemical mapping performed by Vicq et al. (2015) showed that previous concentrations of As, Cd, Fe, and Mn obtained from 241 sediment samples from the Iron Quadrangle were higher than the average of earth's crust values. The anomalous levels of these trace elements were attributed to a combination of natural geological features and anthropogenic interferences.

In addition to the mining activities, which historically represented the main sources of metals to the DRB, other economic activities installed along the river also constitute relevant sources of both inorganic and organic contaminants to the Doce River (ANA, 2015). These include the largest steel complex in Latin America (named “Vale do aço”, or Steel Valley) located within the middle DRB, as well as agriculture, food and beverage factories, and disposal of untreated domestic wastes, which have contributed to affect the water quality of this watershed in the last decades (Vasconcelos et al., 2011). However, contamination by organic substances in the DRB is usually neglected, with very few studies reporting their presence, levels, and composition (de Souza et al., 2022; Lima et al., 2015; Longhini et al., 2022).

Notwithstanding the pre-existing chronic contamination scenario of the DRB, on November 5th, 2015, a catastrophic dam failure occurred in Mariana, Brazil. The Fundão Dam abruptly collapsed, discharging approximately 43 million of m^3 of iron-rich tailings wastes into the DRB. The slurry wave created at the head-waters of the Upper DRB extended along the 663.2 km trajectory (downstream 3 river watercourses) and reached the estuary at Linhares, and then the Atlantic Ocean, where a set of legally protected areas are located (IBAMA et al., 2015). Unfortunately, the disaster represented one of the worst tailing dam failures in modern history, based not only on the largest volume of tailing released and the long traveled distance, but also the irreversible socio-environmental damages (Fernandes et al., 2016). Fluvial morphology was greatly altered by the rapid displacement of the large tailing waste volume (Santos et al., 2019), as sediment supply and erosion processes were deeply affected (Hatje et al., 2017). Negative impacts immediately affected both humans and wildlife, and 19 people died. Impacts included the destruction of an entire small district (Bento Rodrigues), massive mortality of aquatic biota and terrestrial fauna, adversely affecting indigenous and riparian communities, vegetation losses, cutting off the water supply, interruption of fisheries and agricultural practices and hydroelectric power generation (de Carvalho et al., 2018).

Some authors, including the mining company Samarco, reported that the slurry had no toxic properties because it presented low concentrations of hazardous metals and metalloids (Almeida et al., 2018; Figueiredo et al., 2019). On the other hand, independent studies, including academics, provided evidence that the dam collapse dispersed previously contaminated soils and river sediments, distributing trace elements (Davila et al., 2020; Duarte et al., 2021; Vergilio et al., 2021), and organic chemicals, along the DRB, which ultimately have been deposited in the estuary and adjacent coastal shelf (Longhini et al., 2022; Queiroz et al., 2022), and are also bioaccumulating in exposed organisms (Ferreira et al., 2020; Gabriel et al., 2020). These studies initially reported the anomalous levels of metals in water and also agreed that concentrations of trace elements dissolved and associated with suspended particulate matter (SPM) significantly decreased a few months after the dam rupture event (GIAIA, 2016; IGAM, 2020; Vergilio et al., 2021).

However, long-term effects, considering fluctuations of metal levels associated with environmental factors and other pollution sources along the river course, remain to be determined. In addition, unlike inorganic contaminants, no study has investigated the co-occurrence of inorganic and organic pollutants along the DRB, evidencing a gap in the water quality assessment in the river basin. Such research would facilitate the interpretation of the potential environmental and human risks associated with environmental contamination, especially because their cumulative effects remain overlooked. The present study aimed to investigate water and sediment contamination processes to i) characterize the distribution of inorganic and organic contaminants in the DRB three-to-four years after the Fundão Dam rupture; ii) analyze the Spatio-temporal variations of these chemicals associated with their main anthropogenic sources; iii) evaluate more comprehensively, the contamination levels, considering cumulative effects of the dam rupture combined with other polluting sources; and, iv) provide the first environmental background data for organic contaminants along the whole extension of the DRB.

Materials and methods

In this study, concentrations of inorganic and organic contaminants were determined in water and sediment samples obtained in 8 sampling sites along the Doce River, during the wet and dry seasons of 2019, according to the following detailed description.

Study area

The experimental design of this study considered regional differences within the DRB, with sampling sites strategically selected to represent the main sources of pollution of the respective region and to allow the determination of possible gradients of contamination across the river (Fig. 1, Table 1). In addition, a reference site not affected by the iron tailing spill, and potentially less impacted by other human activities, was also selected.

The DRB is located in the Southeast region of Brazil, draining an area of approximately $84,000 \text{ km}^2$ in an extension of 888 km of its main course, and providing water resources for a population of over 3.6 million habitants. The 8 sampling sites were designated to represent each of the three regions compassing the DRB: Upper, Middle (both in the Minas Gerais state - MG), and Lower Regions (Espírito Santo state - ES), which are under the influence of different human activities (ANA, 2015). The Upper Region is characterized by intense mining activities, for the extraction of iron (by large-scale corporations) and gold (by illegal artisanal mining). Historically, high loads of metals from mining tailing wastes have been discharged into the waterbodies of DRB (Rhodes et al., 2018; de L. Rodrigues et al., 2014; Varejão et al., 2009). Moreover, the Fundão Dam, which collapsed in 2015, is located in the Upper DRB. After more than 150 km downstream, the Middle Region of the DRB encompasses the largest urban centers of the basin. It is estimated that only 41 of the 209 riparian cities present a minimal service of sewage collection and treatment (below the national average of 43% treated sewage, (ANA, 2017), thus the rivers receive a high input of raw or poorly treated sewage. Steel mill industries and a large-scale pulp industry (Cenibra) are also responsible to impact significantly the river in the Middle DRB. Finally, in the Lower DRB region, livestock and crops are present and consist of main sources of contaminants, together with domestic sewage.

In addition, there are 4 hydropower plants installed along the Doce River, which altered the water flow and sedimentation rates. The combined effects resulting from the hydropower plants and the removal of vegetation (only 27% of the native vegetation remains on the DRB) increase the susceptibility to erosion (58% of the total area). The Hydropower plant Reservoir of Candonga, distant 120 km from the breakage, retained approximately 30% of the mining tailing released by the dam failure.

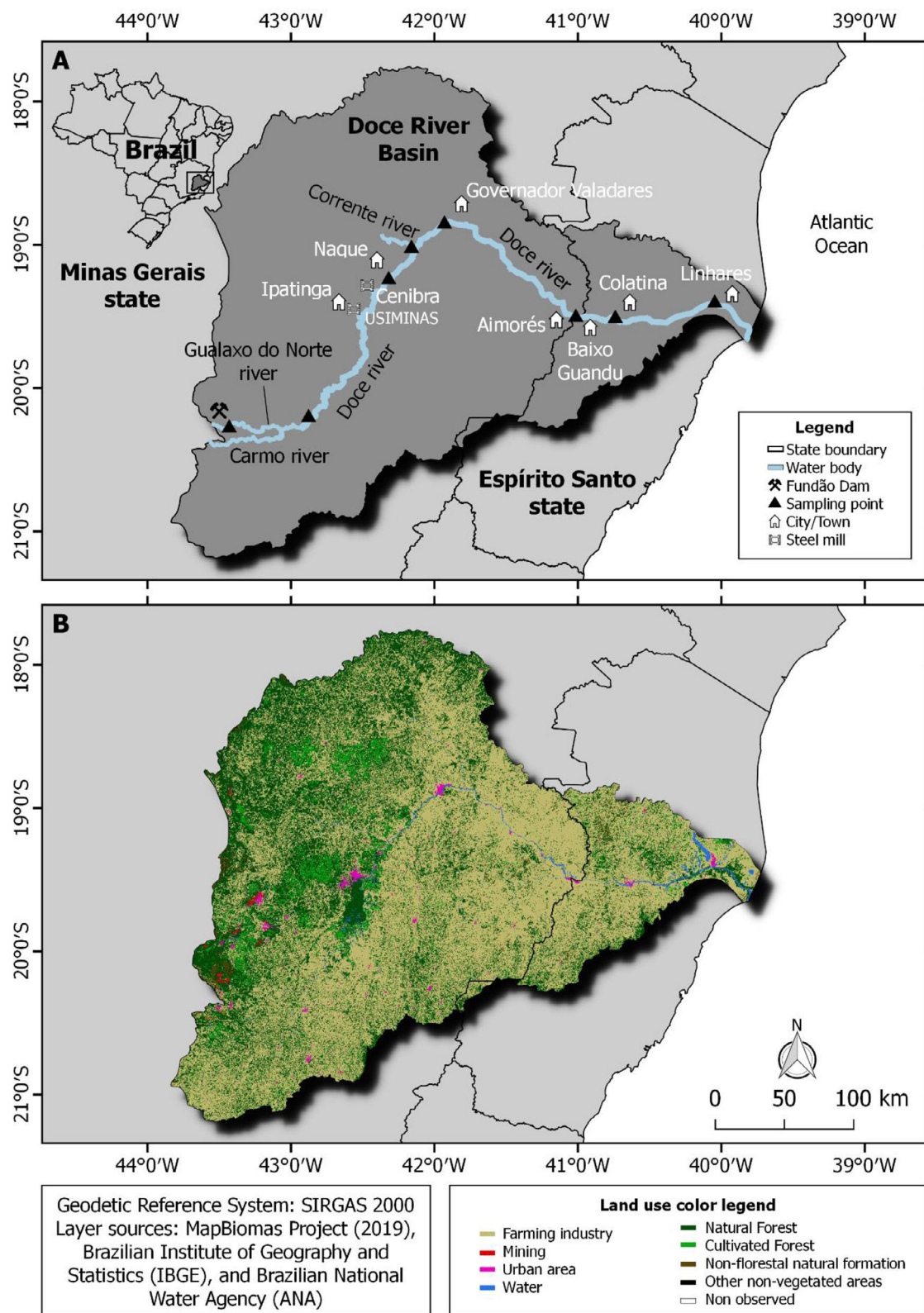


Fig. 1. Map (adapted from (Yamamoto et al., 2022a), of the sampling sites along the DRB, selected according to their sources of pollution and spatial-distribution. The sites closest to the dam rupture and more influenced by mining activities are located at the Upper DRB: 1- GUA (Gualaxo do Norte River) and 2 – CAN (Candonga reservoir). Following the river course, two sampling sites selected in the Middle DRB are more impacted by industrial and domestic effluents: 3 – NAQ (Naque city), and 5 – GOV (Governador Valadares city), and a reference site that was not affected by the iron tailing spill 4 – REF (Reference site at the Corrente Grande River). Lastly, in the Lower DRB, three sampling sites endangered by agriculture and urban pollution were chosen: 6 – AIM (Aimorés city); 7 – COL (Colatina city); 8 LIN (Linhares city).

Table 1

Description of the main human activities performed for each sampling site along the DRB, according to ANA (2015).

Region	Sampling sites	Human activities
...	1. Gualaxo do Norte River(GUA), Mariana, MG	Intense mining activity, with iron and artisanal gold extraction. The closest site to the Fundão dam collapse is in Mariana municipality, MG.
	2. Candonga (CAN), HPP Reservoir, Rio Doce, MG	Hydropower Plant Reservoir that retained approximately 10 million m ³ of mining tailing introduced into Doce River.
...	3. Naque, MG (NAQ)	Downstream site of steel mill industries and a large-scale pulp mill industry (CENIBRA)
	4. Reference site (REF), Corrente River, Periquito, MG	Doce River affluent selected as the Reference site. The river crosses a region within a restrictive Environmental Protected Area (Corrente River State Park) and was not affected by the mud wave.
	5. Governador Valadares (GOV), MG	The largest urban center of the Doce River basin (245 thousand hab.), with non-treated wastewater release
...	6. Aimorés, ES (AIM)	Crops (mainly coffee) and livestock
	7. Colatina, ES (COL)	Crops and urban impact (Colatina district)
	8. Linhares, ES (LIN)	Crops and urban impact (Linhares district)

Together with the spatial distribution of chemicals, seasonal variations were assessed, as two sampling surveys were conducted, during the wet (Jan – Feb) and dry seasons (Jul–Ago) of 2019, respectively. The water samples (3 L per sampling site and season, divided into three field replicates of 1 L each) were directly collected with their own bottle for storage, at a depth approximately below 30 cm from the surface, in three different sites of each location. For the analysis of inorganic contaminants, the water samples (1 L per sample in triplicate) were stored in new clean polyethylene bottles, and for the organic chemicals analysis, in new clean amber glass bottles, and kept at 4 °C in the absence of light. Samples were acidified with HNO₃ 0.5% for analysis of inorganic contaminants. The surface sediment samples were obtained with plastic shovels and were collected more than 5 m distant from the river bank and with a maximum sediment thickness of 10 cm. Samples of 1 kg were collected in three different sites for each location along the Doce River (a total of 3 kg per location, for triplicate analysis). Then, aliquots were separated and stored in white new polyethylene bottles for inorganic analysis and new aluminum containers for organic analysis; they were kept frozen at –20 °C until analysis.

Physicochemical parameters of water

Datasets of quali-quantitative physicochemical parameters of water (QQPM) available in the literature (IGAM, 2020; RENOVA, 2019) were used to explore potential relationships with variations of chemicals concentrations (detailed description in Yamamoto et al., 2022). A total of six weekly (wet season) and three monthly reports (dry season) obtained from RENOVA Foundation and a database from IGAM (four measurements per season) were selected considering the same period of sampling campaigns of wet (Jan–Feb) and dry seasons (Jul–Ago) of 2019 for the following parameters: Chlorophyll a (mg/L), Cyanobacteria (mg/L), Conductivity (mS/cm), temperature (°C), turbidity (NTU), Dissolved oxygen (mg/L), pH and average precipitation (mm). The database from 6 (GUA, CAN, NAQ, GOV, AIM, REG from RENOVA) and 5 fixed stations (GUA, CAN, NAQ, GOV, AIM from IGAM) located at comparable regions of the eight sites used in our own investigation, was used instead of in-situ measurements since it can better reflect variations of water conditions at a more representative evaluation considering higher sampling analysis. The QQPM was obtained through automatic monitoring of fixed devices and sensors distributed along the Doce River Basin (IGAM, 2019; RENOVA, 2019). Additionally, the databases from IGAM (2020) providing QQPM of sampling campaigns from 2010 to

2015 (same sites and seasons mentioned above), were also used as data from the pre-rupture event for comparison with data from the literature (review table S1 in the Supplementary Material) and the obtained in this study.

Inorganic chemicals in the water

The analysis of trace elements in water was performed by two different procedures (two different institutions) for determining total concentrations of Al, As, Cd, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Ti, V, Zn (procedure 1 for filtered samples with PTFE membrane of 0.45 µm pore size (Merck Millipore™) performed by IO-USP Institution; including Ca, Sc; procedure 2 performed by UFPR Institution, for unfiltered samples centrifuged for 10 min at 3500 rpm; including Li, Mg, Na) in the same samples previously acidified with HNO₃ 0.5%. More details about both procedures are described in the data paper (Yamamoto et al., 2022b, co-submitted). The results were expressed as mg.L⁻¹ and compared to CONAMA Resolution 357/2005 (CONAMA, 2005) for waters of Class II. The quantification was performed in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) according to (US EPA, 2014) and SMEWW 3125B (1998).

Sediment grain size distribution and organic matter

The analysis of the composition and grain size distribution of sediment was performed following the wet and dry sieving method (CETESB, L6.160). The contents of sand, silt, and clay were determined according to the classification of Wentworth (1922), as well as the grain size classifications according to (Shepard, 1954).

The quantity of Organic Matter (OM) was determined through the method of wet organic matter oxidation ((Walkley and Black, 1934), modified by (Camargo et al., 2009), by titration with 0.5 N ammoniacal ferrous sulfate (AFS) solution.

Inorganic chemicals in sediments

Trace elements (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sc, Ti, V, and Zn) were extracted by acid digestion from 1 g of lyophilized sediment and were quantified according to (US EPA, 2014) in an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as triplicate samples, representing a total of 48 samples. Total Hg in sediment was analyzed according to Santos et al. (2005). The metal concentrations in the sediment were

expressed as $\mu\text{g.g}^{-1}$ of dry sediment (samples were weighed after dehydration by lyophilization).

Enrichment factor

The anthropogenic impacts based on sediment samples from the Doce River were initially estimated by the enrichment factor. This approach is commonly used to distinguish natural and anthropogenic sources by comparing metal concentrations from a contaminated site with background levels from uncontaminated sites. Background levels of trace elements from different locations of the Doce River Basin and the Iron quadrangle (Table S2 in Supplementary Material), were obtained by Vicq et al. (2015) who analyzed sediment samples from 2011 (4 years before the dam rupture) collected in dozens of waterbodies from DRB. Although those levels could, at some point, be influenced by past chronic contamination due to the historical mining exploitation and the installation of other human activities in the region, they were used here to compare temporal variations before and after the dam rupture event. Site-specific values for the three different regions of the DRB were considered for the calculation, according to Vicq et al. (2015). The levels of Al were selected as a normalizing element to distinguish geogenic and anthropogenic sources, due to its lower mobility and considering the high background levels of iron that could underestimate EF values (Leão et al., 2019; Reis et al., 2020). The EF was calculated according to the formula:

$$EF = (M_{\text{sed}}/Al_{\text{sed}})/(M_{\text{back}}/Al_{\text{back}})$$

Where M_{sed} is the concentration of the trace element measured in the sediment sample; Al_{sed} is the respective concentration of Al in the same sediment sample; M_{back} is the background concentration of the metal; Al_{back} is the background concentration of the reference element (Al).

Organic chemicals in water and sediments

The organic chemicals in the water were determined according to the method of Solid-Phase Extraction-SPE (Method 3535A) proposed by USEPA (2007), validated by (Cavalcante et al., 2007) for the PAHs and according to (Duaví et al., 2021) for the Pyrethroids. The detailed methodology (including QA/QC) is described by Yamamoto et al. (2022b, submitted data paper). The common names and physicochemical properties of the 21 PAHs and 5 Pyrethroids (Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin, and Bifenthrin) selected for this studied are detailed in the Supplementary material.

Differently from inorganic analysis, sediments sampled for organic analysis were stored in aluminum containers as composite samples, formed by a mixture of three subsamples, in equal proportions (a total of 8 composite samples per season). The extraction of organic contaminants was carried out according to (Morais et al., 2019), consisting of the extraction of total organic contaminants followed by clean-up for separation into three fractions with different polarities.

The identification and quantification of the 21 PAHs and 5 Pyrethroids in the water and sediment extracts were performed with chromatography-mass spectrometry (GC-MS; Shimadzu, QP2010 model). The injector temperature was settled to 260 °C, and the injection volume was 2 μL in splitless mode. Separation was performed using a capillary column DB-5 Agilent J&W (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane) of 30 $m \times 0.25$ mm i.d. and 0.25- μm film. All chromatographic conditions and details for the determination of PAHs and Pyrethroids can be found in de Morais et al. (2019) and Duaví et al. (2021).

All data were subject to rigorous quality control procedures. Analysis of the reagent blanks demonstrated that the analytical system used (glassware, solvents, and materials) was free of contamination. The identity and quantity of analytes of interest were confirmed by chromatographic validation using the Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (www.eurachem.org), and all figures of analyt-

Table 2

Levels of anthropogenic impacts determined by Enrichment Factor and Sediment Quality Guidelines. The values and colors indicate: <1 no enrichment, 3–5 minor enrichment, 5–10 moderate enrichment, 10 moderately severe enrichment, 10–25 severe enrichment, 25–50 very severe enrichment. For SQG the values indicated: 0.1 to 0.2 – not polluted, 0.2 to 0.3 – minor pollution, 0.3 to 0.4 – moderate pollution, 0.4 to 0.7 moderately severe pollution, >0.7 severe pollution.

EF		SQG	
< 1	No enrichment	< 0.2	Not polluted
3–5	Minor enrichment	0.2–0.3	Minor pollution
5–10	Moderate enrichment	0.3–0.4	Moderate pollution
10–25	Moderately severe enrichment	0.4–0.7	Moderately severe pollution
25–50	Severe enrichment	>0.7	Severe pollution

ical merit are found in (Morais et al., 2019) and (Duaví et al., 2021). During the extraction process, control of the loss of the analytes was performed with surrogate standards (SS) using the protocol developed by Cavalcante et al. (2012) for complex matrices. The recovery of the SS ranged from 51.49 to 93.81%, which is considered suitable for the study of complex matrices, such as sediment (Cavalcante et al., 2012).

Sediment quality guidelines

The potential toxicity of inorganic and organic chemicals detected in sediment samples from the DRB was first evaluated by their comparison with the threshold effect levels (TEL) and probable effect levels (PEL) proposed by the Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME, 1999) and the CONAMA Resolution (454/2012) for dredged material (which established the same values of PEL proposed by CCME, 1999). Both individual (12 priority PAHs) and total PAHs were compared to estimate the frequency of samples exceeding TEL and PEL values. Subsequently, regional values of trace elements (As, Cr, Cu, Ni, Ti, V) proposed by Bonnail et al. (2017) were also used to calculate the “Sediment Quality Guidelines” quotient (SQGq). The average SQGq was calculated by dividing the trace elements or total PAH concentrations in sediment samples by their respective PEL levels obtained in the literature above mentioned (both from legislation and regional values). The average SQGq was classified based on Fairey et al. (2001) and Moreira et al. (2021): 0.1 to 0.2 – not polluted, 0.2 to 0.3 – minor pollution, 0.3 to 0.4 – moderate pollution, 0.4 to 0.7 moderately severe pollution, >0.7 severe pollution (Table 2).

PAHs indexes

The quotient of Low Molecular Weight PAH (LMW) by the High Molecular Weight (HMW) represents a useful diagnostic index to indicate the predominance of pyrogenic and petrogenic sources of PAHs (G. M. Fernandes et al., 2022; Yunker et al., 2002). For the calculation of the index (LMW/HMW) it was firstly considered the summation of total LMW (: Nap, 1-MNap, 2-MNap, Acy, Ace, Fl, DBT, Phen, Ant.) and HMW (Flr, Pyr, Bep, Bap, IcdP, DahA, BghiP, BaA, Cry, Per, BbF, and BkF). Subsequently, the ratio of LMW/HMW indicated the predominance of pyrogenic (<1) and petrogenic (>1) sources. Other indexes used to predict PAHs sources include i) Ant + Fen; ii) Fltr + Pyr; iii) IP/(IP+BghiP); iv) BaA/BaA+Cry, with more detailed information available in the supplementary material.

Statistical analysis

The statistical analysis of the data considered a previous check of outliers (Grubb test), homoscedasticity (Bartlett test), and normality (Shapiro-Wilk's test). Parametric data were analyzed by two-way ANOVA (Analysis of Variance) followed by the Tukey-Kramer test to verify potential spatial-temporal differences (comparing sites and seasons for each chemical variable). Non-parametric data that did not reach the normality assumptions, even after log transformation, was analyzed

by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test with the R Studio Software. Concentrations of pollutants are shown as average values of the replicates (when available) and differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$. Correlation analysis of physicochemical parameters and inorganic and organic chemicals was performed by the Spearman test according to (Mukaka, 2012), with modifications, where significant ($p < 0.05$) correlation coefficient (r) from ± 0.0 to 0.3 indicates negligible correlation; ± 0.3 to 0.5 indicates low correlation; ± 0.5 to 0.7 indicates moderate correlation; and ± 0.7 to 1.0 indicates strong correlation. However, only significant moderate and strong correlations will be mentioned in this study.

Multivariate analyzes (such as Principal Component Analysis, PCA) were performed in the R studio software to observe associations between contaminants distribution along the sites of the DRB. Due to the variation of data among sampling sites and between trace elements concentrations, it was also tested different methods of pre-processing data (in addition to raw data), including log transformation and scaling (subtracting the average value followed by dividing the standard deviation for each variable).

The PCA was performed to reduce the dimensionality of data for each group of chemicals measured in the different environmental matrices (total inorganics in the water of each procedure; inorganics in sediments, PAHs in sediment). Data of physicochemical-parameters in water from RENOVA reports were also analyzed concomitantly with total inorganics in the water (Supplementary Material). Variables containing few samples (observations) above the detection limit were excluded from the original data matrix (e.g. As, Cd, PAHs, and Pyrethroids in the water), selected those more relevant (greater data variation) to explain their sources of contamination. The Broken Stick Method was used to consider the interpretation of the most significant principal components (Jackson, 1991; Pielou, 1975).

For comparing associations between chemicals of different matrices (e.g. total inorganics in water for both procedures; Inorganic x organic chemicals in the sediment) we used the redundancy analysis, using the average values for each site corresponding to the observations and the chemicals in columns as variables. Differently from PCA, this constrained ordination technique was used to assess how much of the variation in one set of variables could be explained by the variation of another set of variables, exploring the relationships between two matrices (e.g. Inorganic x organic chemicals in the sediment).

Results

Physicochemical parameters of water

The temperature of water tended to increase downstream of the river, as altitudes decreased, varying from 28.4 (GUA) to 31.3 °C (COL) during the wet season and 19.7 (GUA) to 24.4 °C (GOV) during the dry season. Regarding rainfall rates obtained from RENOVA (2019) reports, as expected, the volumes were higher during summer (DRB average of 22.2 mm in the wet season (Jan-Feb); 8.7 mm in the dry season (Jul-Agu)), since the rainy season lasts from October to March and dry season from April to September in Southern Brazil.

According to data provided by IGAM and Renova, all physical-chemical parameters (chlorophyll a, cyanobacteria, dissolved oxygen, and pH) were within legal limits established by legislation during wet (Dec-Feb) and dry season (Jun-Ago) of 2019, except for turbidity, which exceeded values for some sites (Table S3 in the Supplementary Material). Turbidity was significantly higher during the wet season of 2019 in CAN (127.8 for IGAM data) and NAQ (67.1 for RENOVA data) and lower in GUA (28.8 and 55.5 for RENOVA and IGAM data respectively).

Inorganic chemicals in the water

In general, all inorganic chemicals showed higher levels of water during the wet season when compared to the dry season, following previous

studies (review table in Supplementary Table S1). Total levels of Al and Fe (procedures 1 and 2) in water were greatly higher during the wet season (Table 2 and Tables S4 and S5 in the Supplementary Material), especially for sites at the Middle and Lower DRB (maximum of 2.1 mg Al $\cdot L^{-1}$; and 1.4 mg Fe $\cdot L^{-1}$, respectively for procedure 1). Interestingly, those levels tended to increase significantly spatially ($p < 0.001$, Upper < Lower DRB for wet season), and temporally downstream the river (fluctuations levels between seasons significantly higher for the Lower DRB).

Notably, both levels of Al and Fe showed very significant, correlations ($p < 0.001$, moderate to strong) with turbidity levels and temperature, considering the analysis of wet and dry seasons for those sites that corresponded spatially with the monitoring fixed stations from RENOVA reports (Table S6, Supplementary Material).

On the other hand, Mn in the water exceeded about 4 times legal limits only in the Upper RDB (maximum of 0.51 mg $\cdot L^{-1}$ at GUA, during the wet season, according to procedure 1) and decreased significantly along the river, in both wet ($p < 0.001$, GUA vs. other sites) and dry season surveys ($p < 0.005$, GUA vs. other sites, excepting NAQ). The total inorganic chemicals measured in non-filtered centrifuged samples (procedure 2) showed similar levels when compared to acidified filtered samples (procedure 1, please check the results of multivariate analysis and in Supplementary Material Table S3). For other trace elements in water, dissolved values of Ni and Cu exceeded legislation limits in REF, during the wet season, and Cu levels were also higher in AIM. On the other hand, As and Cd were below the limit of detection for the majority of the samples.

Physicochemical parameters of sediments

Sediment textural analysis evidenced the differentiated physiographic characteristics from the DRB. A higher percentage of fine particles (silt and clay) was observed in the REF (69%) > NAQ (36%) > CAN (31%) sediments during the wet season of 2019 (Supplementary Material and raw data described by Yamamoto et al., 2022, co-submitted). On the other hand, fine and medium sands were more abundant in GUA, followed by those sites located at the Lower DRB (AIM, COL, LIN). The concentration of OM differed significantly between the sampling sites, being higher at REF (Corrente River) and lower at the Upper Doce River sites, especially in GUA (Table S7 in the Supplementary Material and co-submitted data paper from Yamamoto et al., 2022).

Inorganic chemicals in sediment

The analysis of sediments showed that the Upper DR..... region presented the highest levels of As in sediments, especially in the dry season for GUA site ($p < 0.05$, when compared to REF and Lower DRB), where concentrations reached 47.7 mg $\cdot kg^{-1}$ that is almost three times above recommended levels for dredged materials (Table 3 and Table S8 in the Supplementary Material (CONAMA, 2012). Similarly, the mercury concentrations in GUA (dry season) were three times above the limits established by the national legislation. Cadmium concentrations also exceeded the legal limits in samples from the Upper DRB (5.1 mg $\cdot kg^{-1}$, GUA wet season), with values also above the Iron Quadrangle background levels (1.1 mg $\cdot kg^{-1}$) and significantly higher than REF and Lower DRB sites.

Iron and manganese represented the most abundant transition metals in the sediment of the Doce River, again prevailing at the sampling sites closest to the origin of the river, namely GUA. The levels of these metals in sediment both showed to decrease along the river path, especially for Mn, which dropped up to 25 times its levels from the Upper to the Lower DR....., when comparing GUA (2.3 mg $\cdot g^{-1}$) and LIN (0.09 mg $\cdot g^{-1}$) sites ($p < 0.001$). The levels of other trace elements, such as Al, Cr, and Ti in sediments (Supplementary Material, Table S4) showed an opposite behavior, being significantly higher in the Middle DR..... (NAQ

Table 3

Concentrations of main inorganic chemicals (mg.L⁻¹) detected in the water and the sediment (μg.g⁻¹) of the DRB during the wet and dry seasons of 2019. Bold values indicate concentrations exceeding legislation levels, proposed by CONAMA, in water (Class II) and dredged material used to compare with sediment samples.

Site	Season	WATER (mg.L ⁻¹)						SEDIMENT (μg.g ⁻¹)				
		Al		Fe		Mn		Al	As	Hg	Fe	Mn
	Procedure	1	2	1	2	1	2					
TEL (CCME, 1999)												
CONAMA												
(357/2005 – wat.;												
454/2012 – sed.)												
Vicq et al., 2015												
GUA	IQ 2012											
	Wet	0.12^d	0.13^c	0.28 ^b	0.33^{bc}	0.41^a	0.45 ^a	4713.6 ^b	29.1^c	0.05	13.9%	780
	Dry	0.04	0.03 ^d	0.12	0.14 ^{de}	0.13	0.13 ^a	4941.5 ^c	47.8^a	1.49^a	286,494.3 ^a	11,373.1 ^a
CAN	Wet	0.19^{cd}	0.21^{bc}	0.92^{ab}	0.97^{ab}	0.04 ^b	0.04 ^{bc}	11,432.6 ^b	6.2 ^{ab}	0.06	35,743.7	309.1 ^b
	Dry	0.05	0.05 ^{cd}	0.26	0.29 ^{bc}	0.03	0.03 ^{bc}	20,214.3 ^{abc}	26.7^{abc}	0.16	59,277.2 ^{bc}	1270.6 ^b
NAQ	Wet	0.43^{bcd}	0.61^{ab}	0.97^{ab}	1.09^{ab}	0.09 ^b	0.09 ^b	9426.8 ^b	7.6 ^{ab}	0.06	38,465.4	348.5 ^b
	Dry	0.20	0.27^a	0.40	0.46^{ab}	0.05	0.05 ^{ab}	27,904.6 ^{abc}	17.4^{ab}	0.09	81,969.9 ^{abc}	1252.0 ^{ab}
REF	Wet	0.44^{cd}	0.27^{bc}	1.07^b	1.07^{ab}	0.04 ^b	0.03 ^{bc}	49,931.0 ^a	3.6 ^b	0.05	67,228.3	729.8 ^{ab}
	Dry	0.12	0.14^{ab}	0.53	0.58^a	0.03	0.03 ^{bc}	59,276.0 ^a	5.9 ^{bc}	0.29	85,333.9 ^{ab}	870.8 ^{ab}
GOV	Wet	0.37^{bcd}	0.41^{abc}	0.76^{ab}	0.82^{abc}	0.03 ^b	0.04 ^{bc}	12,434.4 ^{ab}	2.5 ^b	0.08	20,543.5	125.7 ^b
	Dry	0.07	0.09 ^{bc}	0.15	0.16 ^{de}	0.02	0.02 ^{bc}	42,707.0 ^{ab}	13.0 ^{abc}	0.21	76,734.4 ^{abc}	452.3 ^b
AIM	Wet	1.34^{ab}	1.25^a	1.47^b	1.54^a	0.06 ^b	0.05 ^b	18,902.6 ^{ab}	2.0 ^b	0.12	27,520.1	256.4 ^b
	Dry	0.08	0.05 ^{cd}	0.09	0.09 ^e	0.02	0.02 ^c	16,893.0 ^{abc}	2.5 ^c	0.30	22,167.8 ^{cd}	105.1 ^b
COL	Wet	2.18^a	0.44^{bc}	1.41^b	0.37^c	0.04 ^b	0.01 ^c	9258.5 ^b	3.6 ^b	0.07	17,081.4	94.4 ^b
	Dry	0.08	0.09 ^{bc}	0.12	0.13 ^e	0.02	0.02 ^{bc}	39,474.6 ^{ab}	6.8 ^{abc}	0.13	40,260.8 ^{cd}	203.7 ^b
LIN	Wet	1.16^{abc}	1.18^{ab}	0.93^{ab}	1.00^{abc}	0.04 ^b	0.04 ^{bc}	10,172.9 ^{ab}	3.5 ^b	0.07	16,694.2	152.7 ^{ab}
	Dry	0.10	0.15^{ab}	0.20	0.24 ^{cd}	0.04	0.04 ^{bc}	7343.3 ^{bc}	5.1 ^{bc}	0.09 ^b	16,145.8 ^d	92.8 ^b

The average values of all inorganic chemicals measured in the water and sediments are shown in the Supplementary Material. Raw data containing all replicates for each sampling site are presented in the data paper from Yamamoto et al. (2022).

and GOV) when compared to the Upper and Lower DR....., but the concentrations of Cr levels remained below the legal limits.

Overall, the enrichment factor revealed that the sediment from GUA site was the most contaminated along the Doce River (Table 3), showing the highest values for As (32.0), Cd (56.8), Hg (49.6), and Mn (56.1). Additionally, it was revealed that 23% of the measurements from GUA (dry season) samples exceeded the Probable effect levels (PEL), according to (CCME, 1999), and presented the highest quotient of Sediment Quality Guidelines (1.03), indicating the worst pollution scenario and highly potential to be toxic. It is noteworthy that sediments from other sites (CAN, NAQ and GOV) also presented concentrations exceeding threshold effect levels and relatively high SQGq (>0.4), indicating potential moderate to high pollution from inorganic chemicals.

In comparison with site-specific freshwater sediment quality values proposed by (Bonnail et al., 2017) for the Ribeira do Iguape River (Southeast Brazil), the sediment quality guidelines quotients were greatly increased (~10 fold) than CCME values (1999) (Table 4), suggesting an even worse condition of pollution in DRB. However, since SQGs are better used at the screening level within sediment quality assessment, ecotoxicological and bioaccumulation data would be required for a proper interpretation of the chemical data produced in this paper and the literature.

Organic chemicals in the water

In the water samples, most of the PAHs were below the limit of detection (Table S9 in the Supplementary Material), and the ΣPAHs showed low values, below the limit established for freshwaters in Australia, that is 30 μg.L⁻¹ (Adeniji et al., 2019; ANZECC & ARMICANZ, 2000). Only 7 PAHs were detected, and Pyrene was the most frequent, reaching 0.5 μg.L⁻¹ in AIM (dry season) and GOV (dry season). A similar concentration was also found for Fluoranthene in AIM (dry season). Naphthalene was detected in waters of GUA, CAN, AIM, COL, and LIN at the range of 0.01 to 0.03 μg.L⁻¹ (co-submitted paper from Yamamoto et al., 2022b).

Pyrethroids levels in the water were below the limit of detection for most of the sampling sites, except by Cypermethrin, which had the highest concentrations in the Upper DRB (2.76 μg.L⁻¹ in GUA, wet season).

Organic chemicals in sediments

In general, the levels of PAHs in the sediment were below the national limits proposed for dredged material (CONAMA 454/2012), with exception of benzo[a]anthracene (BaA), which was the most abundant PAH in some sampling sites (Table 4 and Table S10 in the Supplementary Material). Concentrations of BaA were higher in NAQ (793 μg.kg⁻¹, wet season) and COL (632 μg.kg⁻¹, dry season), exceeding the legal values. Chrysene was another PAH detected at concentrations closest to the threshold level in these same locations (669.87 μg.kg⁻¹ in NAQ). The sum of PAHs and the SQGq indicated that COL (dry season, 3639.8 μg.kg⁻¹ ΣPAH; 0.31 SQGq) and NAQ (wet season, 2726.3 μg.kg⁻¹ ΣPAH; 0.28 SQGq) represented the most polluted sites in terms of PAHs occurrence, while the Upper sites showed the lowest levels, suggesting a non-contaminated scenario by PAHs and an absence of relevant PAHs sources in the upper DRB.

The ratio LMW/HMW indicated the predominance of pyrogenic sources of PAHs for all the sampling sites of the DRB (<1), ranging from 0.3 (GUA site) to 0.007 (AIM site), especially at the Middle and Lower DRB, which had the highest levels of HMW showing strong correlations (R>0.8). It was observed that sites at the Upper DRB showed higher levels of low molecular weight PAHs, indicating potential petrogenic sources in this region (Table 5). Other calculated indexes also confirmed the pyrogenic sources from petroleum and also wood and coal combustion (Table S11 in the Supplementary Material). Only Perylene showed a positive significant correlation with sediment grain size parameters and Organic matter quantities (R>0.6).

Unexpectedly, the concentrations of total Pyrethroids in the sediments were higher in the Upper DRB (256.23 μg.kg⁻¹ in GUA, data paper from Yamamoto et al., 2022b), especially during the wet season, when compared to the Middle and Lower DRB.

Table 4

Anthropogenic impact estimated by Enrichment Factors (EFs) and Sediment Quality Guidelines calculated for trace elements concentrations in sediment samples of Doce River above background and Probable effects levels.

		ENRICHMENT FACTOR							SEDIMENT QUALITY GUIDELINES			
		As	Cd	Cu	Fe	Hg	Mn	V	>TEL	>PEL	SQGq	SQGq*
GUA	Wet	20.44	17.79	10.90	3.84	1.75	44.19	6.80	8 (33%)	2 (8%)	0.39	5.12
	Dry	32.04	56.79	5.59	16.41	49.63	56.09	11.41	9 (37%)	7 (29%)	1.03	7.34
CAN	Wet	3.38	6.40	1.78	3.24	3.37	1.54	10.75	4 (16%)	0	0.16	1.90
	Dry	8.25	6.66	3.24	3.04	4.81	3.58	16.82	9 (38%)	2 (8%)	0.45	6.32
NAQ	Wet	5.95	9.01	1.81	6.28	4.76	2.42	11.40	5 (21%)	0	0.20	2.19
	Dry	4.62	6.81	1.54	4.52	2.36	2.94	9.98	9 (37%)	2 (8%)	0.40	4.83
REF	Wet	0.75	3.54	1.21	3.14	1.71	4.05	9.09	3 (12%)	0	0.22	3.00
	Dry	0.77	3.39	1.26	3.36	8.22	4.07	9.11	8 (33%)	0	0.34	3.78
GOV	Wet	1.96	5.43	2.14	1.88	5.19	0.93	10.29	2 (12%)	0	0.13	1.51
	Dry	1.94	4.66	2.06	2.05	4.11	0.98	8.87	12 (50%)	2 (8%)	0.47	5.26
AIM	Wet	0.49	2.06	1.39	1.79	4.47	1.14	7.67	2 (8%)	0	0.15	1.75
	Dry	0.88	1.71	1.20	1.62	13.08	0.52	6.03	3 (12%)	0	0.17	1.38
COL	Wet	1.83	2.43	1.48	2.27	5.30	0.86	7.37	0	0	0.11	1.30
	Dry	0.80	1.40	1.18	1.26	2.39	0.43	4.97	8 (33%)	0	0.26	3.27
LIN	Wet	1.61	2.12	1.58	2.02	4.78	1.26	7.38	0	0	0.11	1.39
	Dry	3.28	2.62	1.34	2.71	8.84	1.06	5.58	0	0	0.11	1.21

TEL - Threshold Effect Levels; PEL- Probable Effect Levels (PEL) proposed by the Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME, 1999) and the CONAMA Resolution (454/2012) for dredged material.

* site-specific sediment quality values proposed by Bonnail et al. (2017) to calculate sediment quality quotients.

Table 5

Concentrations of main and total (ΣPAH) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) detected in the sediment of the DRB during wet and dry seasons of 2019 and calculated quotient of Sediment Quality Guidelines and Low/High Molecular Weight ratio. Bold values indicate levels exceeding legal limits or indicate a higher pollution scenario for SQGq levels.

	Season	Fltr	Pir	BaP	DahA	BaA	Cri	ΣPAH	>TEL	SQGq	LMW/HMW
TEL		111	53	31.9	6.22	31.7	57.1				
PEL		2355	875	782	135	385	862				
GUA	Wet	12.2	3.7	NA	NA	NA	7.3	32.0	1 (7.7%)	0,003	0.281
	Dry	NA	NA	NA	NA	NA	2.2	3.3	1 (7.7%)	0,000	0.324
CAN	Wet	24.5	5.0	NA	NA	NA	8.9	42.3	1 (7.7%)	0,003	0.082
	Dry	1.2	1.6	NA	1.0	NA	17.7	33.4	1 (7.7%)	0,003	0.109
NAQ	Wet	248.1	226.1	188.6	20.8	794.0	669.9	2726.3	6 (46%)	0,285	0.013
	Dry	105.2	102.3	90.4	6.9	121.8	92.2	773.8	5 (38%)	0,063	0.030
REF	Wet	61.1	13.6	NA	NA	NA	16.0	140.8	1 (7.7%)	0,006	0.049
	Dry	2.6	2.4	NA	NA	NA	NA	109.8	1 (7.7%)	0,001	0.033
GOV	Wet	127.0	132.7	127.3	14.4	179.2	265.7	1191.9	6 (46%)	0,105	0.035
	Dry	44.1	54.1	NA	17.9	117.9	166.3	759.7	4 (30%)	0,04	0.022
AIM	Wet	48.7	12.4	NA	NA	3.6	20.2	125.4	1 (7.7%)	0,058	0.179
	Dry	6.4	8.4	NA	4.1	18.1	39.6	225.2	1 (7.7%)	0,011	0.007
COL	Wet	284.6	296.2	152.3	20.9	100.0	83.6	1429.3	6 (46%)	0,100	0.031
	Dry	717.4	566.0	275.5	29.0	632.1	519.9	3639.8	6 (46%)	0,313	0.033
LIN	Wet	164.9	236.0	155.7	16.1	336.7	321.5	1642.4	6 (46%)	0,150	0.009
	Dry	198.5	140.5	92.1	9.6	180.2	191.1	1080.3	6 (46%)	0,092	0.030

Multivariate analysis

PCA analysis

Inorganics in water. The PCA for inorganic contaminants in water, explained 55.9% of data variation in the first principal component (PC), followed by 28.1% of data variation for the second component (Supplementary Material, Table S13). The first PC separated Al, Fe, and K with positive loadings for the variables, while Ca and Mn showed negative values, which allowed to discriminate sampling sites presenting higher concentrations of these two groups of inorganic contaminants dissolved in water. The sites at the Upper DRB presented the highest levels of Mn and Ca, while the Middle and especially the Lower DRB showed the highest levels of Al and Fe (Fig. 2) which were strongly correlated by the Spearman analysis ($R = 0.9$, Table S6). On the other hand, the second PC better discriminated the variance of these chemicals during wet and dry seasons, evidencing the higher levels of dissolved Al, Fe, and Mn in water during the wet season.

When physical-chemical parameters (RENOVA, 2019) were plotted with inorganic chemicals, the first PC showed positive loadings for tem-

perature and turbidity associated with Fe, Al, and Zn (measured in our samples), with higher score values for the sites of the middle and lower DRB (Figure S2 in the Supplementary Material).

Inorganics in sediments. For the sediment data, the PCA analysis explained 64.2% of data variation in the first PC, followed by 19.5% of data variation for the second component (Supplementary Material, Table S15). The first PC showed only positive loadings for the variables, which allowed to discriminate sampling sites presenting higher concentrations of inorganic contaminants (Upper and Middle DRB) than those less contaminated (Lower DRB) (Fig. 2). On the other hand, the second PC separated the chemicals in the sediment, with As, Cd, Fe, Hg, and Mn more closely related to the GUA site (Upper), while Al, Cu, Cr, Ti, V, Zn were associated to the sites from the Middle DRB (NAQ, REF, GOV). Although not so clearly evident as the inorganics data of water, the PCA analysis also demonstrated that the concentrations of chemicals in sediment were potentially higher during the dry season, when compared to the wet season.

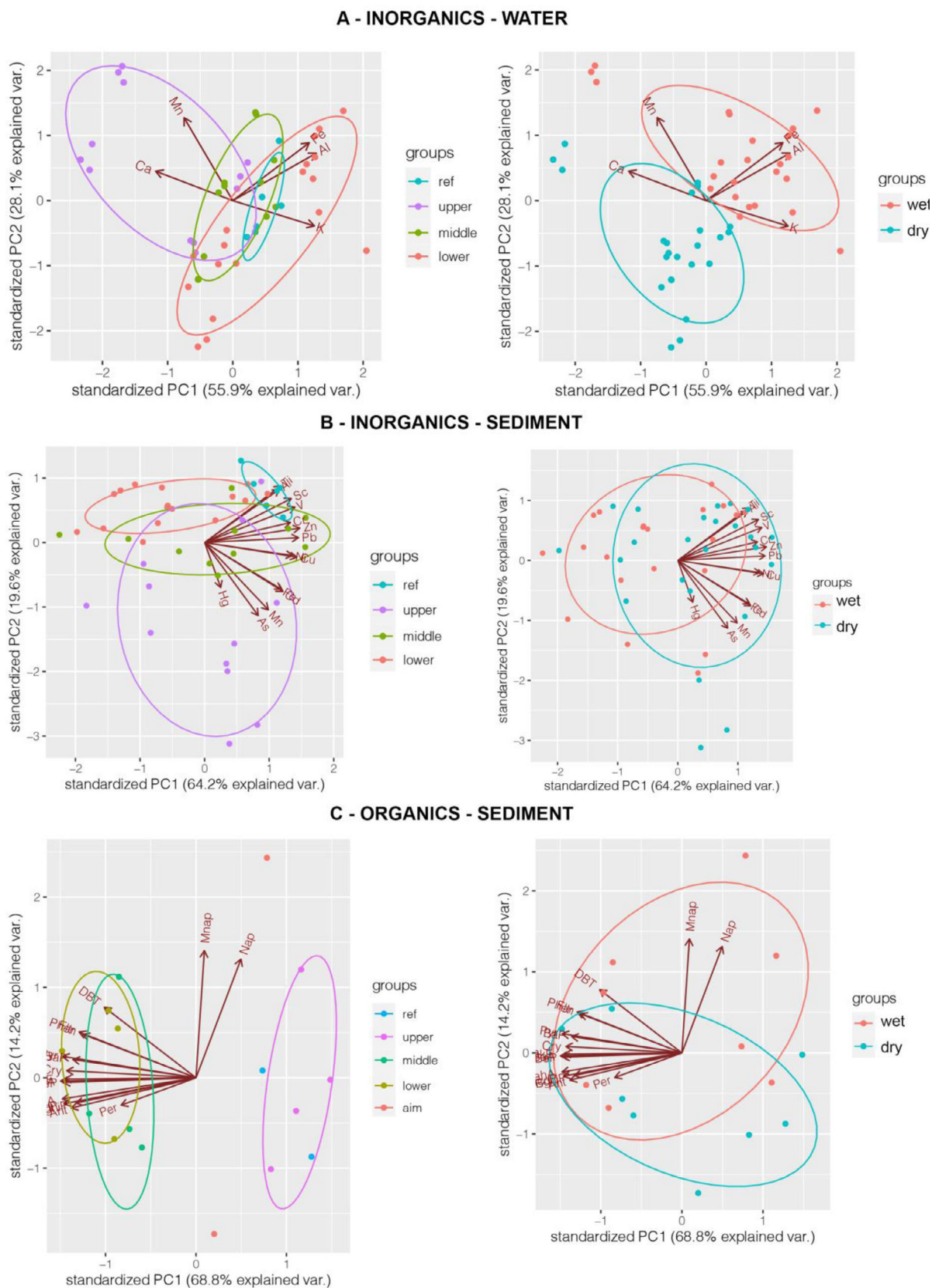


Fig. 2. Principal Component analysis of the inorganic chemicals in the water (A) and the sediment (B), and PAHs in the sediment (C), evidencing the variation of data from different groups of chemicals associated with distinct regions of the Doce River Basin (upper, middle, lower and reference site), and the two sampling seasons clustering (wet and dry seasons).

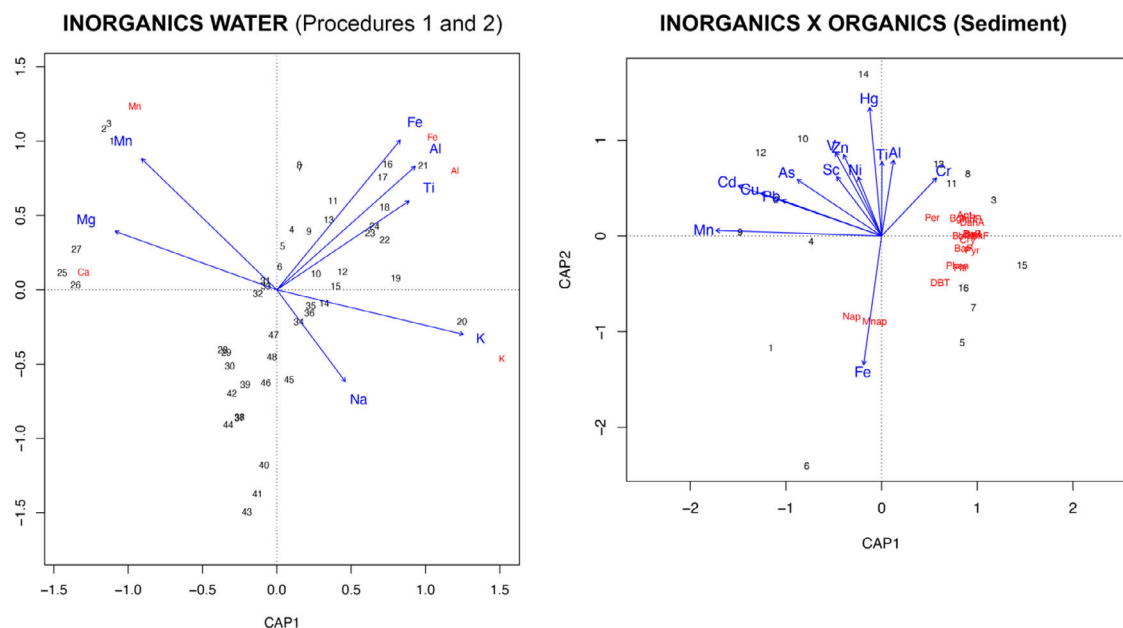


Fig. 3. Redundancy analysis of inorganic chemicals data from different procedures of total fractions in water, and inorganic and organic chemicals data from sediment samples of the Doce River Basin from wet and dry seasons of 2019.

Organics in sediment. PCA analysis of the organic data (PAHs) explained 67% of the variance by the first PC, and 14% for the second component (Fig. 2). The first PC separated the lower molecular weight PAHs (NAP and MNAP) from the highest MW PAHs, clearly distinguishing the sites from the upper DR..... region of the middle and lower regions (with exception of AIM site), which showed the highest levels of HMW PAHs. On the other hand, the reference site and the Upper region presented the lowest levels of PAHs. When comparing the seasons, it was possible to observe more differences for the NAP and MNAP levels from the Upper region and AIM, while the other chemicals and sites did not express great variation.

Redundancy analysis

The redundancy analysis showed a high correlation between levels of inorganics in water, for both procedures 1 (filtered water samples) and 2 (centrifuged samples) (Fig. 3), confirming the reliability of the data, when obtaining similar results performed by distinct institutions.

When plotting inorganics and PAHs in sediments (Fig. 3), there was no overlapping distribution among the chemicals, except by Fe and low molecular weight PAHs (NAP, MNAP). In general trace elements were separated in component 1, showing a higher relationship between Cr, Al, Ti, and other HMW PAHs for component 2.

Discussion

The results obtained in this study evidenced the persistence of environmental chemicals potentially hazardous in the DRB, as a consequence of the historical anthropogenic impacts, including mining activities and other pollution sources, combined with the mobilization of contaminants after the dam rupture. Even with an apparent reduction of the chemicals' levels after the first-year post-rupture (IGAM, 2020), the wet season showed to be an important factor responsible for (re)mobilizing the inorganic contaminants from sediment to water and carrying them downstream.

Physicochemical parameters

The higher turbidity, during the wet season of 2019, is reflected by the increased river flow in this period (Longhini et al., 2022), when the

erosion process and resuspension of the sediment by turbulent fluxes are intensified, thus indicating the high concentration of suspended solids. Notably, even though turbidity decreased after 2016 (from 137.0 to 54.4 NTU in 2019) and attenuated by the dilution downstream, significantly higher values are still observed when compared to the pre-rupture data (14.5 NTU), remaining outside the levels recommended by legislation, especially in events of intense rainfall rate (e.g. 127 NTU in wet season of 2020, IGAM, 2020). However, exceptionally in January 2019 (DRB average of 14.9 mm) there was a lower rainfall rate when compared to other years (DRB average of 38.9 mm from 2010 to 2015), which may have influenced the bioavailability of the contaminants and the sediment transport downstream.

Higher turbidity values in 2019 than background levels (IGAM 2020), were probably related to the anomalous SPM produced by the dam breakage (Hatje et al., 2017), which altered flocculation patterns with delayed settlement and a narrower range of floc size (Grilo et al., 2018; Hatje et al., 2017). Accordingly, the higher incidence of fine particles associated with turbidity in NAQ and at the Lower DRB may be explained by the tendency of sediments to deposit in these sites, which was described as presenting an elevated composition of silt (47.5%) and clay (10.6%) (Almeida et al., 2018; Figueiredo et al., 2019; Segura et al., 2016). The retention of 10 million m³ of the tailing waste by the hydropower reservoir of Candonga (CAN) and increased dredging operations due to the inoperability of the floodgates should also explain the higher quantities of fine particles and turbidity in this site.

In sampling stations from the Gualaxo do Norte River, in the Upper Region, the high percentages of fine particles reported immediately after the disaster may have been partially removed by dredging operations and/or carried downstream, as they are not expected to naturally accumulate in a higher energy site like GUA (Reis et al., 2020). Figueiredo et al. (2019), after monitoring the tailing from 2015 to 2018, suggested that the lighter particles were carried downstream while the heavier materials remained deposited. In fact, the higher percentage of fine particles increased six months after the disaster in sites of the Lower DRB (Duarte et al., 2021; Vergilio et al., 2021), evidencing the transport and deposition of muddy particles along the river. According to some studies, SPM showed to act as an important carrier of metals along the DRB, since major metals were detected in this matrix (Sá

et al., 2021; Vergilio et al., 2021). The high correlation between turbidity (RENOVA, 2019) and the levels of Fe and Al in the water for samples analyzed in our study, corroborates this hypothesis. In the estuarine region, (Queiroz et al., 2022) reported a decrease of Fe oxyhydroxides crystallinity in sediment sampled in 2019, implicating a higher susceptibility of its reductive dissolution and consequently release of adsorbed contaminants into the water column.

Organic matter (OM) is another important geochemical carrier that is implicated with the potential for the adsorption and distribution of contaminants. While the highest levels of OM in the REF site may be explained by the contribution of the surrounding natural riparian vegetation, not necessarily indicating a pollution status (Naiman et al., 2005), the higher levels found in GOV may be associated with the discharge of domestic and industrial effluents without proper treatment. Lastly, in the Lower DRB, the OM may be also related to the use of fertilizers in agriculture, in addition to the discharge of domestic and industrial effluents. Following these results, the thermotolerant coliform levels detected by IGAM, which already exceeded legal limits even before 2015, represent another critical parameter reflecting the discharge of wastewater without treatment in many riparian cities along the DRB, especially in the Middle DRB. According to the National System of Sanitation Information (SNIS, 2020), some sites analyzed in this study, like Governador Valadares and Colatina cities (population above 200 thousand people), present low or even zero rates of sewage treatment. Additionally, it could be mentioned the potential increase of organic matter content by untreated industrial and domestic wastes in the Middle and Lower DRB influencing the SPM and turbidity (Bright et al., 2020; EPA, 2022).

Contaminants in water

Although different physical-chemical parameters may significantly influence the bioavailability of environmental contaminants, their abundance, distribution, and persistence along the DRB are better explained by their pollution sources, combined with seasonal variation influencing hydrological processes.

Since the dam failure, many studies have reported the high levels of metals along the DRB, especially immediately after the event (review table S1 in the Supplementary Material), with fewer considering their distribution along the whole river or longer-term impacts (GIAIA, 2016; Hatje et al., 2017; IGAM, 2020; Vergilio et al., 2021). In general, the literature reported that within the first months after the breakage, the levels of some trace elements, such as dissolved Fe and total Mn in water, were anomalous, with maximum concentrations in the range of 1.166 mg.L^{-1} (Segura et al., 2016) and $728 \text{ (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)}$, respectively, exceeding several times legal thresholds.

The most abundant trace elements, Fe and Mn, still exceeding legal limits in the water even four years after the environmental disaster, are both associated with their natural abundance in the IQ region, but also by the intense iron ore exploitation during the last decades by large companies, including the dam rupture event. On the other hand, higher levels of Al in the Middle and Lower DRB may be a result of soil carryover and the occurrence of erosion processes on the river banks associated with industrial effluents, especially for producing metal alloys, such as steel mill industries, or even as aluminum sulfate used as a flocculating agent for wastewater treatment (Rodrigues and Souza Corrêa, 2020).

The higher concentrations of dissolved metals during the rainy season evidenced by PCA analysis, together with the increased turbidity, are explained by the greater resuspension of the sediments and the (re)mobilization of metals to the water column, as predicted initially by some authors (Fernandes et al., 2016; Hatje et al., 2017). For the coastal region, an opposite behavior was observed, since higher wave heights in the dry season imply a greater resuspension of the sediments, leading to a worse environmental quality (Longhini et al., 2022; Sá et al., 2021). In addition, it may increase runoff of agrochemicals and fertilizers in soils, containing Al, Cu, Ni, and Zn, especially at the Middle and Lower DRB. Therefore, higher rainfall rates in the Doce River resulting in in-

creased water level and river flow decreases water quality and spread of more contaminants SSP-associated downstream the river.

When comparing the results with the background levels from 2010 to 2015 (IGAM, 2021), it was possible to observe that concentrations of Fe and Al dissolved in waters sampled in 2019 increased after the dam rupture event (considering both seasons). In addition, the variations of levels for these elements within seasonal influence became more prominent nowadays, when compared to the pre-rupture period. Those differences were more evident in the Lower DRB, possibly because: i) the sampling survey for its sites, performed in February, occurred in a month of higher rainfall rate when compared to January (when the other sites were sampled), ii) long-lasting settlement rates and/or higher amounts of fine particles increasing the sediments' resuspension and the release of Fe and Al in the water column, as reported for the estuarine region (Longhini et al., 2022; Sá et al., 2021).

On the other hand, the higher levels of Mn are more restricted to the Upper DRB, suggesting this element may have a lower potential to be carried downstream the river in comparison to other trace elements.

Inorganic chemicals in sediments

The anthropogenic impacts are even better understood when concentrations of chemicals detected in water are integrated with sediment data. The most prominent inorganic chemicals detected in sediments were Al, As, Fe, and Mn, reflecting their abundance attributed to regional geologic features intensified by anthropogenic impacts, especially mining exploration.

In general, the elements that showed the highest enrichment factors in the period immediately after the disaster were: Fe, Mn, Cd, Ti, Hg, and Zn, especially in the headwaters of DRB (Reis et al., 2020; Vergilio et al., 2021). Other authors also reported increased levels of Fe and other trace elements downstream the river, until the mouth at Linhares district, indicating a non-clear dilution pattern and concentration peaks of dissolved elements along the river (Duarte et al., 2021; Hatje et al., 2017). The unclear gradient of pollution downstream the river, immediately after the dam rupture, probably was related to the mobilization and transport of the slurry wave associated with previous chronic contamination, in sites where SPM was greatly deposited.

Although the greatest impacts were observed in the following year after the event (IGAM, 2020), and apparently decreased from 2017 to 2019, most parameters remained above background levels, showing great variability under seasonal influence. Four years after the environmental disaster, our results for EF, SQG indexes, and multivariate analysis revealed this potential gradient of contamination, with the worse sediment quality for sites at the Upper DRB, mainly the GUA site (the closest to the mining dam rupture), reducing towards the Lower DRB. These moderate to highly polluted conditions could be even worse classified when considering regional values of TEL and PEL proposed by Bonnail et al. (2017), which are more suitable because those values suggested by the CCME (1999) could underestimate the pollution.

The anomalous levels of As found in the sediment of the Upper DRB could be initially attributed to its natural enrichment in mineral deposits characteristic of the Iron Quadrangle region (e.g., the arsenopyrite, AsFes). But its levels have been greatly intensified by the historical discharge of gold ore residues, which has been conducted for about three centuries. It is estimated that about 390,000 tons of As were released into the DRB drainage, as a result of intensive mining practices (BORBA et al., 2000; A. S. de L. Rodrigues et al., 2013). The illegal artisanal gold extraction still performed nowadays also contributes significantly to the As inputs in the Upper DRB (Rhodes et al., 2018). Costa et al. (2006) stated that As is the most harmful element in the DRB, considering its high toxicity and elevated content in sediments and water.

The concentrations of As found in this study were also higher than the regional background levels described by Vicq et al., 2015 for the IQ region, which was already above than average of the earth's crust.

(Cagnin et al., 2017) demonstrated that As contamination in sediments from DRB was previous to the dam collapse in 2015, and could be attributed to the long-term iron and gold exploitation. The authors also reported high concentrations of As reaching the Doce River Continental Shelf, which was strongly correlated to total Fe and Mn contents, indicating a possible relationship with the mining residues.

Similarly, the higher levels of mercury in the Upper DRB showed to be also related to the gold extraction activities, suggesting that the distribution of these metal(loid)s (As, Hg), are potential tracers of this source of pollution in this watershed. According to Rhodes et al. (2018), background levels (2012) of total Hg and methylmercury in sediment samples from Gualaxo do Norte River ranged from 209 to 1207 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 0.07 to 1.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, with higher concentrations in sites near gold mining and processing. Varejão et al. (2009) reported a similar situation and observed that the total Hg levels, mostly in the elemental form, decreased downstream, ranging from 690.2 to 179.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

The enrichment of these elements (As, Hg) and Mn, when compared to background values obtained in 2011 by Vicq et al. (2015) and levels in impacted sediments (Santolin et al., 2015), indicate a possible relationship with the dam rupture event. On the other hand, iron showed a slighter enrichment, evidencing the previous contamination and spread of this element along the DRB, even before the disaster, as suggested by (Leão et al., 2019).

Despite the lack of national legal limits for metals in sediments, such as Fe and Mn, their relatively high concentrations in the Upper DRB are also associated with the natural geological features intensified by mining activities in the IQ region. The background levels of iron in the IQ (8.2 wt%) are already relatively higher when compared to the earth's crust average levels (5.6 wt%) (A. S. de L. Rodrigues et al., 2014). Nevertheless, it is also possible that the distribution of Fe has been influenced by the intense transport of iron ore in uncovered train wagons (112,172 thousand tons in 2018), over the last decades, through a railroad that travels beside the Doce River pathway. Very few studies address the potential impacts of railroads as contaminant sources, which introduce both trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons into the surrounding soil, increasing the risks of wildlife exposure (Pollock and St. Clair, 2020; Wiłkomirski et al., 2011).

Even though some authors declared the nontoxic properties of the tailing waste, with a high content of iron and manganese and a low capacity of ion exchange adsorption (Almeida et al., 2018; Figueiredo et al., 2019; Fongaro et al., 2019), others state that excessive Fe concentrations can influence the distribution of hazardous metals in downstream basins, since Fe-Mn oxyhydroxides present high capacity of adsorption and complexation with them, especially for the arsenate (BORBA et al., 2000). A statistical relationship was observed by Rhodes et al. (2018) for mercury in the sediment and MnO, revealing a possible role of the manganese oxides as adsorbent material and geochemical carrier of Hg. In the Carmo River, manganese and iron oxides seem to be also an important factor in the contamination of As, Cu, and Zn by adsorption and co-precipitation processes (Terezinha Costa et al., 2006).

In addition, Segura et al. (2016) and (Sá et al., 2021) stated that some elements, including As, Fe, Mn, and Al, have a high potential to remobilize from sediment to water, by a particulate fraction, depending on the influence of variable physical-chemical parameters (e.g., pH). Thus, particulate-associated contaminants may be transported and distributed along the DRB and the adjacent coastal zone. In special, the fine particles' characteristics from the tailing waste could play an important role in storing contaminants (Reis et al., 2020). The elevated concentrations of iron in the water of the Middle and Lower sites also evidenced its potential to mobilize from sediment to water. On the other hand, GUA exhibiting the highest levels of Fe in sediments and the lowest in water could be explained by its lower SPM/fine particles/turbidity values in this region, which may reflect a lower accumulation of the iron tailing more recently, and thus a reduced resuspension rate.

Finally, for other trace elements, such as Al, their occurrence along the DRB may also be associated with the steel industries from the "Steel valley complex", in addition to natural geological sources. Curiously, as unexpectedly, the sampling site REF, which was considered the lowest impacted, presented the highest concentrations of Al and Ti in the sediment. Despite that, concentrations of Al in water were significantly lower than other sites at Middle and Lower DRB. Although below the maximum value established by national legislation, the levels of Pb and Zn were also higher in REF compared to others from DRB, suggesting the influence of potential anthropogenic source(s) in a restrictive Environmental Protected Area (Corrente River State Park). Other elements such as Cr and Ni exceeding PEL levels in the Middle DRB could be considered as trace markers for industrial and domestic wastes in this region. According to Santolin et al. (2015), high levels of Cr in sediments (1371 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) from Doce River, near Ipatinga city (Middle DRB), were mainly associated with industrial activities. Still, Pb, Zn, and Hg interacting with Fe-Mn oxides and organic matter were related to domestic and industrial discharges into the DRB (Santolin et al., 2015). Therefore, these results also demonstrated the occurrence of metals introduced by those additional sources occurring in the Middle and Lower watercourse, than mining activities in the Upper DRB.

Organics

In addition to inorganic contaminants introduced by mining and industrial wastes, the present study showed the occurrence of PAHs in water and sediments along the DRB, especially in the Middle and Lower regions. Only one previous study from 2015 demonstrated the occurrence of PAHs in the Middle DRB (municipality of Ipatinga), which is characterized by intense steel industry activity (Lima et al., 2015). According to the study, PAHs with higher molar masses (4 to 6 rings) and toxic potential, such as benzo[a]pyrene, were detected in water at concentrations of 90.9 ng. L⁻¹, above the legal standards. More recently, another study showed the presence of Persistent organic pollutants at the Doce River mouth, indicating the impact of such human activities even before the dam rupture event (de Souza et al., 2022) and how those levels are varying greatly under the seasonal influence with continuous inputs of iron tailings into longer-term processes (Longhini et al., 2022).

Nevertheless, the higher levels of HMW PAHs, reflecting pyrogenic sources, in sediments from the Middle DRB (NAQ) were expected, since it is located downstream of the steel industries and one of the world's biggest fiber eucalyptus pulp producers (CENIBRA). On the other hand, even though less predictable, the high concentrations in Lower DRB (COL) may be related to diffuse and point sources situated in the surrounding area. According to Gomes et al. (2019), effluents released into the Doce River by a large industrial pole situated in Colatina City were associated with genotoxic effects in fish exposed to this water. The authors also stated that the Doce River was previously polluted, even before the disaster, by other human activities. The site GOV also showed a significant occurrence of these chemicals from pyrogenic sources and related emissions from urbanization, since it is the most populous riparian city located in the DRB.

Our data also showed that the Upper DRB has a low occurrence of PAHs, with non-detectable levels for most of the measured compounds, especially at GUA. The reference site (REF) also presented low concentrations of PAH, except for the Perylene, which may have natural sources (Maioli et al., 2010) and showed the highest values when compared to other locations in the DRB. Therefore, these sampling sites (GUA, CAN, REF) may not have significant anthropogenic sources of PAH. On the other hand, even unexpectedly, GUA and CAN were the locations showing higher levels of Pyrethroids in the water and sediment, during the wet season, evidencing greater consumption and use of insecticides in this region. Accordingly, higher levels of pyrethroids and other pesticides were also detected in surface waters of a sub-basin of the DRB (Manhuaçu), mainly during the wet season, in a region with intense agricultural activities from coffee crops (Soares et al., 2012, 2013). The

same authors estimated significant risks of human exposure for the local population. [Gomes et al. \(2022\)](#) also reported the occurrence of herbicides and pharmaceuticals at concentrations posing potential risks to aquatic biota, at the Upper DRB, attributed to urban wastewaters as the main sources of these contaminants.

From the stretch of the Middle DRB....., there are several human activities, such as industries, domestic effluents, and agriculture that continuously introduced organic contaminants into this watershed for decades. Therefore, while the Upper DRB is characterized by a higher load of inorganic chemicals, the Middle and Upper are described herein as both impacted by the co-occurrence of inorganic and organic contaminants, as demonstrated by PCA analysis. The presence of these organic pollutants in the DRB, even neglected by many studies, is important for an appropriate characterization of ecological and human risks.

Finally, it became evident that both acute (environmental disaster) and chronic contamination events (historical and current multiple pollution sources) are responsible for the deteriorated water quality of the Doce River. Despite the lack of consistent background levels for organic data, reports of inorganic chemicals indicated the historical contamination of these elements introduced both from mining and other human activities. Subsequently, the dam rupture event spread the hazardous chemicals deposited in the sediment along the DRB and the adjacent coastal zone, which may permanently be increasing the risks for human health and biota, especially during wet seasons. A proper assessment of the impacts and risks at DRB requires considering the occurrence of both inorganic and organic combined as complex mixtures. In addition, the plan for restoring the environmental quality in the DRB must consider the multiple pollution sources, including not only the Fundão dam disaster, but also the effluents and leachates from mining activities, agricultural runoff, and domestic and industrial effluents.

Conclusion

This study showed the occurrence and persistence of hazardous chemicals in the Doce River Basin, from historical and current sources of contaminants, after the influence of a major environmental disaster that spread these chemicals along the watercourse. Besides, the concentrations of metals in the water along the river remained above legal limits and over background values, especially during the wet season. This environmental factor showed to significantly increase the resuspension of sediment and transport of high amounts of metals toward the sea, with possible adverse implications for the coastal and marine environments.

In addition to seasonal influence, distribution and levels of inorganic and organic chemicals are mainly associated with their multiple sources along the river. An apparent gradient of contamination by metals exists in the DRB, with higher levels of inorganic chemicals in the Upper DRB due to the unsustainable exploitation of mineral resources. While other human activities, such as steel industries and the poor treatment of domestic sewage and agricultural practices, are also responsible to hamper water quality improvement downstream of the river. This persistence of hazardous chemicals in the water and sediments of the DRB, above levels recommended by legislation, should raise a greater concern of public authorities to take effective remediation initiatives.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

F.Y. Yamamoto: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration. **G.F.E. Pauly:** Methodology, Validation, Investigation. **L.S. Nascimento:** Methodology, Validation, In-

vestigation, Writing – review & editing. **G.M. Fernandes:** Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing. **M.P. Santos:** Methodology, Validation, Investigation, Writing – original draft. **R.C.L. Figueira:** Validation, Resources. **R.M. Cavalcante:** Validation, Resources. **M.T. Grassi:** Validation, Resources. **D.M.S. Abessa:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Data Availability

Chemical datasets of environmental samples (2019) from the Doce River Basin, Brazil (Original data) (Mendeley Data)

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) through the research grant Process 2016/15229-1 and 2018/23279-4.

Additionally, the authors would like to thank for the kind assistance of the fishermen from the Doce River and the RENOVA foundation during the field surveys, as well as the support from the staff of the different laboratories (NEPEA-UNESP, LAQUIMAR-IO, USP, LACOR-UFC, Environmental Chemistry Group-UFPR). We also thank the MSC candidate Maysa Ueda for the procedure of extraction of inorganic chemicals from sediment samples and the Ph.D. candidate Larissa Ajala Batista for designing the map of the area of study. The authors would like to thank Professor Ronaldo Nascimento (UFC) for the use of the GC-MS for the analysis of the PAHs. DMSA thanks CNPq for the financial support (Grants #311609/2014-7 and #308533/2018-6).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.hazadv.2023.100250](https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100250).

References

- Adeniji, A.O., Okoh, O.O., Okoh, A.I., 2019. Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Water and Sediment of Buffalo River Estuary, South Africa and Their Health Risk Assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 76 (4), 657–669. doi:10.1007/S00244-019-00617-W/TABLES/5.
- Agostinho, A.A., Thomaz, S.M., Gomez, L.C., 2005. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conserv. Biol.* 19 (3), 646–652. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00701.x.
- Almeida, C.A., Oliveira, A.F.de, Pacheco, A.A., Lopes, R.P., Neves, A.A., Lopes Ribeiro de Queiroz, M.E., 2018. Characterization and evaluation of sorption potential of the iron mine waste after Samarco dam disaster in Doce River basin – Brazil. *Chemosphere* 209, 411–420. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.071.
- ANA. (2017). Atlas Esgotos - Despoluição de Bacias Hidrográficas.
- ANA, 2015. Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG.
- ANZECC, ARMCANZ, 2000. Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality. Aquatic Ecosystems, Volume 1. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand.
- Azevedo-Santos, V.M., Frederico, R.G., Fagundes, C.K., Pompeu, P.S., Pelicice, F.M., Padial, A.A., Nogueira, M.G., Fearnside, P.M., Lima, L.B., Daga, V.S., Oliveira, F.J.M., Vitule, J.R.S., Callisto, M., Agostinho, A.A., Esteves, F.A., Lima-Junior, D.P., Magalhães, A.L.B., Sabino, J., Mormul, R.P., ... Henry, R., 2019. Protected areas: A focus on Brazilian freshwater biodiversity. *Diversity and Distributions* 25 (3), 442–448. doi:10.1111/DDI.12871.
- Bonnaill, E., Buruaem, L.M., Morais, L.G., Araujo, G.S., Abessa, D.M.S., Sarmiento, A.M., Ángel DeValls, T., 2017. Integrative assessment of sediment quality in lower basin affected by former mining in Brazil. *Environ. Geochem. Health* 40 (4), 1465–1480. doi:10.1007/S10653-017-9996-4.
- Borba, R.P., Figueiredo, B.R., Matschullat, J., 2003. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. *Environ. Geol.* 44, 39–52. doi:10.1007/s00254-003-0766-5.
- BORBA, R.P., FIGUEIREDO, B.R., RAWLINS, B., MATSCHULLAT, J., 2000. Arsenic in water and sediment in the iron quadrangle, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Geoci.* 30 (3), 558–561. doi:10.25249/0375-7536.2000303558561.
- Bright, C.E., Horton, S.L., Mager, S.M., 2020. Clarifying the waters: the use of turbidity for suspended sediment monitoring in New Zealand. *J. Hydrol. New Zealand* 59 (2), 83–99.

- Cagnin, R.C., Quaresma, V.S., Chaillou, G., Franco, T., Bastos, A.C., 2017. Arsenic enrichment in sediment on the eastern continental shelf of Brazil. *Sci. Total Environ.* 607–608, 304–316. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.162.
- Camargo, O.A., Moniz, A.C., Jorge, J.A., Valadares, J.M.A.S., 2009. Métodos De Análise Química. Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas.
- Carvalho, G.O., Pinheiro, A.de A., de Sousa, D.M., Padilha, J.de A., Souza, J.S., Galvão, P.M., Paiva, T.de C., Freire, A.S., Santelli, R.E., Malm, O., Torres, J.P.M., 2018. Metals and arsenic in water supply for riverine communities affected by the largest environmental disaster in Brazil: the dam collapse on Doce river. *Orbital* 10 (4 Special Issue), 299–307. doi:10.17807/orbital.v10i4.1081.
- Cavalcante, R.M., Filho, N.S.M., Viana, R.B., Oliveira, I.R.N., Nascimento, R.F., Silveira, E.R., Freire, G.S.S., 2007. Utilization of solid-phase extraction (SPE) for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental aqueous matrices. *Quim.Nova* 30 (3).
- Cavalcante, R.M., Lima, D.M., Fernandes, G.M., Duaví, W.C., 2012. Relation factor: a new strategy for quality control in the determination of pesticides in environmental aqueous matrices. *Talanta* 93, 212–218. doi:10.1016/j.talanta.2012.02.015.
- CCME, 1999. Protocol for the derivation of canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*.
- CONAMA, RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005* (RETIFICADA-AO FINAL), 1 (2005). https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005.classificacao_corpos_agua_rtfcdad_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf.
- CONAMA, 2012. RESOLUÇÃO No 454, DE 01 DE NOVEMBRO DE 2012.
- Davila, R.B., Fontes, M.P.F., Pacheco, A.A., Ferreira, M., da S., 2020. Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. *Sci. Total Environ.* 709, 136151. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136151.
- de Souza, A.C., Cabral, A.C., da Silva, J., Neto, R.R., Martins, C.C., 2022. Low levels of persistent organic pollutants in sediments of the Doce River mouth, South Atlantic, before the Fundão dam failure. *Sci. Total Environ.* 802, 149882. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149882.
- Duarte, E.B., Neves, M.A., de Oliveira, F.B., Martins, M.E., de Oliveira, C.H.R., Burak, D.L., Orlando, M.T.D.A., Rangel, C.V.G.T., 2021. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. *Chemosphere* 262, 127879. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127879.
- Duaví, W.C., Gama, A.F., Damasceno, É.P., Moreira, L.B., da Silva, V.P.A., Nascimento, R.F., Cavalcante, R.M., 2021. Are pesticides only a problem from rural areas? The case of a highly urbanised tropical mangrove (Fortaleza, CE, Brazil). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* doi:10.1080/03067319.2021.1946524/, SUPPL_FILE/GEAC_A_1946524_SM6729.PDF.
- EPA, 2007. Method 3535A (SW-846): Solid-Phase Extraction (SPE) | US EPA.
- EPA, 2022. Turbidity Parameter Factsheet | US EPA.
- Fairey, R., Long, E.R., Roberts, C.A., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Hunt, J.W., Puckett, H.R., Wilson, C.J., 2001. An evaluation of methods for calculating mean sediment quality guideline quotients as indicators of contamination and acute toxicity to amphipods by chemical mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (10), 2276–2286. doi:10.1002/etc.5620201021.
- Fang, L., Hipel, K.W., Kilgour, D.M., 1994. Enforcement of Environmental Laws and Regulations: A Literature Review. Springer, Dordrecht, pp. 3–15. doi:10.1007/978-94-017-3081-5.1.
- Fernandes, G.M., Martins, D.A., dos Santos, R.P., de Santiago, I.S., Nascimento, L.S., Oliveira, A.H.B., Yamamoto, F.Y., Cavalcante, R.M., 2022. Levels, source appointment, and ecological risk of petroleum hydrocarbons in tropical coastal ecosystems (northeast Brazil): baseline for future monitoring programmes of an oil spill area. *Environ. Pollut.* 296. doi:10.1016/j.envpol.2021.118709, July 2021.
- Fernandes, G.W., Goulart, F.F., Ranieri, B.D., Coelho, M.S., Dales, K., Boesche, N., Bustamante, M., Carvalho, F.A., Carvalho, D.C., Dirzo, R., Fernandes, S., Galetti, P.M., Millan, V.E.G., Mielke, C., Ramirez, J.L., Neves, A., Rogass, C., Ribeiro, S.P., Scarlot, A., Soares-Filho, B., 2016. Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza e Conservação* 14 (2), 35–45. doi:10.1016/j.ncon.2016.10.003.
- Ferreira, F.F., Duca de Freitas, M.B., Szwinski, N., Vicente, N., Medeiros, L.C.C., Reynaud Schaefer, C.E.G., Dergam, J.A., Sperber, C.F., 2020. Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 0–2. doi:10.1002/ieam.4289.
- Figueiredo, M.D., Lameiras, F.S., Ardisson, J.D., Araujo, M.H., Teixeira, A.P., de, C., 2019. Tailings from Fundão tragedy: physical-chemical properties of the material that remains by candonga dam. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 0–3. doi:10.1002/ieam.4227.
- Fongaro, G., Vianelli, A., dos Reis, D.A., Santiago, A.F., Hernández, M., Michellon, W., da Silva Lanna, M.C., Treichel, H., Rodríguez-Lázaro, D., 2019. Mineral waste containing high levels of iron from an environmental disaster (Bento Rodrigues, Mariana, Brazil) is associated with higher titers of enteric viruses. *Food Environ. Virol.* 11 (2), 178–183. doi:10.1007/s12560-019-09373-5.
- Gabriel, F.Á., Hauser-Davis, R.A., Soares, L.O.S., Mazzuco, A.C.de A., Rocha, R.C.C., Saint, T.D., Saggiaro, E.M., Correia, F.V., Ferreira, T.O., Bernardino, A.F., Santo, E., Oswald Cruz, I., Oswald Cruz, F., de Janeiro, R., Gabriel, F., 2020. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ* doi:10.1101/2020.06.29.177253, 2020.06.29.177253.
- GIAIA, G.I., 2016. RELATÓRIO-TÉCNICO DETERMINAÇÃO DE METAIS NA BACIA DO RIO DOCE (PERÍODO: DEZEMBRO-2015 A ABRIL-2016).
- Gomes, L.C., Chippari-Gomes, A.R., Miranda, T.O., Pereira, T.M., Merçon, J., Davel, V.C., Barbosa, B.V., Pereira, A.C.H., Frossard, A., Ramos, J.P.L., 2019. Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG. *Braz. J. Biol.* 79 (4), 659–664. doi:10.1590/1519-6984.188086.
- Gomes, M.P., Brito, J.C.M., Vieira, F., Kitamura, R.S.A., Juneau, P., 2022. Emerging Contaminants in Streams of Doce River Watershed, Minas Gerais, Brazil. *Frontiers in Environmental Science* 9, 681. doi:10.3389/FENV.2021.801599/BIBTEX.
- Grilo, C.F., Quaresma, V., da, S., Amorim, G.F.L., Bastos, A.C., 2018. Changes in flocculation patterns of cohesive sediments after an iron ore mining dam failure. *Mar. Geol.* 400, 1–11. doi:10.1016/J.MARGE.2018.03.004.
- Hatje, V., Pedreira, R.M.A., De Rezende, C.E., Schettini, C.A.F., De Souza, G.C., Marin, D.C., Hackspacher, P.C., 2017. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Sci. Rep.* 7 (1), 1–13. doi:10.1038/s41598-017-11143-x.
- Heyes, A., 2000. Implementing environmental regulation: enforcement and compliance. *J. Regul. Econ.* 17 (2).
- IBAMA, I.B., do M, A. e dos R, N.R., 2015. Laudo Técnico Preliminar - Impactos Ambientais Decorrentes do Desastre Envolvendo o Rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais.
- IGAM, 2021. Instituto Mineiro de Gestão das Águas - IGAM - Tabelas de Resultados. IGAM.
- IGAM, I.M., 2019. Monitoring Water Quality of the Doce River in the Minas Gerais State (Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais do Rio Doce no Estado de Minas Gerais).
- IGAM, I.M., 2020. Encarte Especial Sobre a Qualidade Das Águas Do Rio Doce Após 5 Anos Do Rompimento De Barragem De Fundão - 2015/2020.
- Jackson, J.E., 1991. A Use's Guide to Principal Components. John Wiley & Sons, Inc doi:10.1002/0471725331.
- Leão, L.P., Costa, R., de, V.F., Leite, M.G.P., Júnior, H.A.N., 2019. Mapeamento Geoquímico do Manganês e Avaliação da Qualidade de Sedimentos Fluviais e Águas Superficiais do Quadrilátero Ferrífero, Brasil Manganese Geochemical Mapping and Quality Assessment of Fluvial Sediments and Surface Waters of Quadrilátero Ferrífero. *Anuário Do Instituto de Geociências - UFRJ* 42, 444–455. doi:10.11137/2019.2.444.455.
- Lima, A., da, C., Heleno, F.F., Afonso, R.J.de C.F., Coutrim, M.X., 2015. Determination of PAHs in surface waters from the Doce and Piracicaba rivers in Brazil. *J. Water Resour. Prot.* 07 (05), 422–429. doi:10.4236/jwarp.2015.75034.
- Longhini, C.M., Rodrigues, S.K., Costa, E.S., da Silva, C.A., Cagnin, R.C., Gripp, M., Lehrback, B.D.C., Mill, G.N., de Oliveira, E.M.C., Hermogenes, C.de C.M., Rodrigues, D.G.F., David, A.M., Gramlich, K.C., Bisi Júnior, R.da C., Gomes, A.A.P., da Silva Filho, J.P., Almeida, J.F., de Souza, K.F., Luz Junior, W.A.R., Sá, F., 2022. Environmental quality assessment in a marine coastal area impacted by mining tailing using a geochemical multi-index and physical approach. *Sci. Total Environ.* 803, 149883. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.149883.
- Maioli, O.L.G., Rodrigues, K.C., Knoppers, B.A., Azevedo, D.A., 2010. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (8), 1543–1551. doi:10.1590/S0103-50532010000800020.
- Morais, P.C.V., Gama, A.F., Fernandes, G.M., Oliveira, A.H.B., Lima, M.F.B., dos Santos, F.R., Martins, D.A., Nascimento, R.F., Cavalcante, R.M., 2019. Emerging and traditional organic markers in areas with multiple anthropogenic activities: development of an analytical protocol and its application in environmental assessment studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102 (1), 66–76. doi:10.1007/s00128-018-2475-5.
- Moreira, L.B., Braga Castro, Í., Fillmann, G., Peres, T.F., Cavalcante Belmino, I.K., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Marins, R.V., Drude de Lacerda, L., Costa-Lotufo, L.V., de Souza Abessa, D.M., 2021. Dredging impacts on the toxicity and development of sediment quality values in a semi-arid region (Ceará state, NE Brazil). *Environmental Research* 193. doi:10.1016/j.envres.2020.110525.
- Mukaka, M.M., 2012. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med. J.* 24 (3), 69–71.
- Naiman, R.J., Décamps, H., McClain, M.E., Likens, G.E., 2005. Structural patterns. In: *Riparia*. Elsevier, pp. 79–123. doi:10.1016/b978-012663315-3/50005-8.
- OECD, 2022. Regulatory Governance in the Mining Sector in Brazil. OECD Publishing, Paris doi:10.1787/63d60aa8-en.
- Pielou, E.C., 1975. *Ecological Diversity*. John Wiley & Sons Issue 574.524018 P5.
- Pollock, S.Z., St Clair, C.C., 2020. Railway-associated attractants as potential contaminants for wildlife. *Environ. Manage.* 66 (1), 16–29. doi:10.1007/s00267-020-01277-6.
- Queiroz, H.M., Ruiz, F., Deng, Y., de Souza Júnior, V.S., Ferreira, A.D., Otero, X.L., de Lima Camêlo, D., Bernardino, A.F., Ferreira, T.O., 2022. Mine tailings in a redox-active environment: iron geochemistry and potential environmental consequences. *Sci. Total Environ.* 807, 151050. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.151050.
- Reis, D.A., Nascimento, L.P., de Abreu, A.T., Nalini Júnior, H.A., Roeser, H.M.P., da Fonseca Santiago, A., 2020. Geochemical evaluation of bottom sediments affected by historic mining and the rupture of the Fundão dam, Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27 (4), 4365–4375. doi:10.1007/s11356-019-07119-1.
- RENOVA, 2019. Monthly Reports of Water Quality (Boletim Mensal da Qualidade da água).
- Rhodes, V., da, P., de Lena, J.C., Santolin, C.V.A., da Silva Pinto, T., Mendes, L.A., Windmüller, C.C., 2018. Speciation and quantification of Hg in sediments contaminated by artisanal gold mining in the Gualaxo do Norte River, Minas Gerais, SE, Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 190 (1). doi:10.1007/s10661-017-6394-4.
- Rodrigues, A.S.de L., Malafaia, G., Costa, A.T., Nalini, H.A., 2013. Evaluation of the mineral exploration influence on sediment composition in the Gualaxo do Norte River Basin (MG-Brazil) based on geochemical and stratigraphic data. *Environ. Earth Sci.* 68 (4), 965–972. doi:10.1007/s12665-012-1799-4.
- Rodrigues, A.S.de L., Malafaia, G., Costa, A.T., Nalini jr, H.A., 2014. Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte river basin, Minas Gerais State, Brazil. *Environ. Earth Sci.* 71 (9), 4177–4186. doi:10.1007/s12665-013-2808-y.
- Rodrigues, J.L., Souza Corrêa, L.R., 2020. Recursos Hídricos em Minas Gerais: Bacia Hidro-

- gráfica Do Rio Mucuri (Portuguese Edition) 1, 1st edition Rodrigues, Jairo Lisboa, de Corrêa, Luís Ricardo Souza - Amazon.com, Appris.
- Sá, F., Longhini, C.M., Costa, E.S., da Silva, C.A., Cagnin, R.C., Gomes, L.E., de, O., Lima, A.T., Bernardino, A.F., Neto, R.R., 2021. Time-sequence development of metal(loid)s following the 2015 dam failure in the Doce river estuary, Brazil. *Sci. Total Environ.* 769, 144532. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.144532.
- Santolin, C.V.A., Ciminelli, V.S.T., Nascentes, C.C., Windmüller, C.C., 2015. Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. *Environ. Earth Sci.* 74 (2), 1235–1248. doi:10.1007/s12665-015-4115-2.
- Santos, E.J., Herrmann, A.B., Frescura, V.L.A., Curtius, A.J., 2005. Simultaneous determination of As, Hg, Sb, Se and Sn in sediments by slurry sampling axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line chemical vapor generation with internal standardization. *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (6), 538–543. doi:10.1039/B502964C.
- Santos, O.S.H., Avellar, F.C., Alves, M., Trindade, R.C., Menezes, M.B., Ferreira, M.C., França, G.S., Cordeiro, J., Sobreira, F.G., Yoshida, I.M., Moura, P.M., Baptista, M.B., Scotti, M.R., 2019. Understanding the Environmental Impact of a Mine Dam Rupture in Brazil: prospects for Remediation. *J. Environ. Qual.* 48 (2), 439–449. doi:10.2134/jeq2018.04.0168.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú.L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F.F., Batista, B.L., 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environ. Pollut.* 218, 813–825. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.005.
- Shepard, F.P., 1954. Nomenclature based on Sand-silt-clay ratios. *J. Sediment. Petrol.* 24 (3), 151–158. doi:10.1097/00006534-195409000-00011.
- SNIS (2020), Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: 25º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos –2019. Brasília: SNS/MDR, 2020. 183 p. <https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/saneamento/snis/diagnosticos-anteriores-do-snis/agua-e-esgotos-1/2019>.
- Soares, A.F.S., Leão, M.M.D., Ferreira De Faria, V.H., Da Costa, Márcia Cassimira Marcos, Moura, A.C.M., Ramos, V.D.V., Neto, M.R.V., Pinheiro Da Costa, E., 2013. Occurrence of pesticides from coffee crops in surface water. *Revista Ambiente Água* 8 (1). doi:10.4136/1980-993X.
- Soares, A.F.S., Leão, M.M.D., Neto, M.R.V., Oliveira, S.M.A.C., 2012. Risk estimate of water contamination by pesticides used in coffee crops. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 16, 425–432.
- Terezinha Costa, A., Arias Nalini, H., Amorim Castro, P.de T., Carvalho de Lena, J., Morgenstern, P., Friese, K., 2006. Sediment contamination in floodplains and alluvial terraces as an historical record of gold exploitation in the Carmo River basin, Southeast Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Acta Hydroch. Hydrob.* 34 (3), 245–256. doi:10.1002/ahch.200400625.
- US EPA, U. S. E. P. A. (2014). *Method 6020B (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*,. Revision 2. Washington, DC. <https://www.epa.gov/esam/epa-method-6020b-sw-846-inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry>.
- Varejão, E.V.V., Bellato, C.R., Fontes, M.P.F., 2009. Mercury fractionation in stream sediments from the Quadrilátero Ferrífero gold mining region, Minas Gerais State, Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 157 (1–4), 125–135. doi:10.1007/s10661-008-0522-0.
- Vasconcelos, M.A.R.V., Barbosa, A.F.S., Menezes, M.A.B.C., Silva, M.A., Rückert, G.V., Oliveira, A.H.de, 2011. Metals in surface waters, margin sediments, forage and cattle hair in flood plains of the rio doce basin, minas gerais, brazil. In: International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011, 27, pp. 15–20. doi:10.1016/j.carres.2010.07.005.
- Vergilio, C.dos S., Lacerda, D., da Silva Souza, T., de Oliveira, B.C.V., Fiorese, V.S., de Souza, V.V., da Rocha Rodrigues, G., de Araujo Moreira Barbosa, M.K., Sartori, E., Rangel, T.P., de Almeida, D.Q.R., de Almeida, M.G., Thompson, F., de Rezende, C.E., 2021. Immediate and long-term impacts of one of the worst mining tailing dam failure worldwide (Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil). *Sci. Total Environ.* 756, 143697. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143697.
- Vicq, R., Matschullat, J., Leite, M.G.P., Nalini Junior, H.A., Mendonça, F.P.C., 2015. Iron Quadrangle stream sediments, Brazil: geochemical maps and reference values. *Environ. Earth Sci.* 74 (5), 4407–4417. doi:10.1007/s12665-015-4508-2.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37 (1), 29–38. doi:10.1097/00010694-193401000-00003.
- Wentworth, C.K., 1922. a scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geol.* 30 (5), 377–392. doi:10.1086/622910.
- Wiłkomirski, B., Sudnik-Wójcikowska, B., Galera, H., Wierzbicka, M., Malawska, M., 2011. Railway transportation as a serious source of organic and inorganic pollution. *Water Air Soil Pollut.* 218 (1–4), 333–345. doi:10.1007/s11270-010-0645-0.
- Yamamoto, F.Y., Pauly, G.E., Nascimento, L.S., Fernandes, G.M., Santos, M.P., Kim, B.S.M., Carvalho, M.U., Figueira, R.C.L., Cavalcante, R.M., Grassi, M.T., Abessa, D.M.S., 2022a. Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster. *Data Brief* 45, 108715. doi:10.1016/J.DIB.2022.108715.
- Yamamoto, F.Y., Souza, A.T.C., Paula, V.de C.S.de, Beverari, I., Garcia, J.R.E., Padial, A.A., de Souza Abessa, D.M., 2022b. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Sci. Total Environ.* 846 (July), 157332. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157332.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33 (4), 489–515. doi:10.1016/S0146-6380(02)00002-5.



Earlier biomarkers in fish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce River Basin[☆]

F.Y. Yamamoto^{a,*}, K. Onishi^a, T.R. Ralha^a, L.F.O. Silva^b, B. Deda^b, T.Y.C. Pessali^c, C. Souza^b, C.A. Oliveira Ribeiro^b, D.M.S. Abessa^a

^a Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil

^b Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^c Museum of Natural Sciences PUC Minas, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Iron tailing waste
Complex mixtures
Multiple pollution sources
Biochemical biomarkers
Native adult fish
Multivariate analysis

ABSTRACT

The Doce River Basin (DRB) represents a well-described watershed in terms of contamination by metals, especially after a major environmental disaster of a mining tailing dam failure. Despite the massive mortality of the ichthyofauna, very few studies addressed the risks to the health of wild fish exposed to complex mixtures of pollutants from multiple sources. The present study proposed to investigate earlier responses of fish for assessing the impacts of multiple sources of pollution, considering: different niches of fish and target organs; and the influence of seasonality, associated with their probable sources of pollution. To achieve that, fish were collected along the DRB, and biomarkers responses were assessed in target organs and correlated with the levels of inorganic and organic contaminants. As one of the most prominent responses, fishes from the Upper DRB showed the highest expression of the metallothionein and oxidative stress parameters which were related to the higher levels of metals in this region due to the proximity of mining activities. On the other hand, higher levels of DNA damage and increased AChE activity from fish sampled in the Mid and Lower DRB were more associated with organic contaminants, from other sources of pollution than mining residues. The integrated biomarker responses also revealed seasonal variations, with higher values in fishes from the dry season, and pelagic fish showing greater variation within the seasons. The multivariate analysis integrating suitable biomarkers with chemical data represented an adequate strategy for assessing the ecological risks in the DRB, allowing the identification of distinct spatio-temporal impacts from multiple sources of contaminants. The continued exposure of the ichthyofauna representing future risks reinforces the need for ecological restoration and the protection of the fauna from the Doce River.

1. Introduction

The Doce River Basin (DRB) is considered critically endangered by multiple contamination sources, such as the gold and iron mining introducing hazardous chemicals since the 17th century and the early 20th century, respectively; and also, by a catastrophic mining dam failure in 2015 that abruptly discharged millions of m³ of iron tailing waste, resuspending chemicals deposited in the sediment (ANA, 2015; IBAMA, 2015; IGAM, 2020; Rhodes et al., 2018). Even though high levels of some inorganic contaminants significantly reduced more than 5

years after the event, they remain exceeding legal limits mainly during the rainy season due to resuspension and remobilization of sediment (Davila et al., 2020; Hatje et al., 2017; IGAM, 2020; Vergilio et al., 2021). Despite the massive mortality of fish after the dam failure, very few studies have investigated the environmental risks for the health of wild fish chronically exposed to contaminants in DRB (Fernandes et al., 2016; Ferreira et al., 2020; Gabriel et al., 2020; Merçon et al., 2022, 2021; Vieira et al., 2022; Weber et al., 2020).

Both essential and non-essential metals, when accumulated at higher levels, may cause significant adverse effects in non-target organisms and

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Sarah Harmon.

* Corresponding author. Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Praça Infante Dom Henrique, s/n - Parque Bitaru, SP, 11330-900, Brazil.
E-mail addresses: fla_yama@hotmail.com (F.Y. Yamamoto), kaori.onishi@unesp.br (K. Onishi), thaisa.ralha@gmail.com (T.R. Ralha), laisfoya@gmail.com (L.F.O. Silva), brunadeda1997@gmail.com (B. Deda), tpessali@hotmail.com (T.Y.C. Pessali), claudibio5@gmail.com (C. Souza), ciro@ufpr.br (C.A. Oliveira Ribeiro), denis.abessa@unesp.br (D.M.S. Abessa).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121720>

Received 11 January 2023; Received in revised form 29 March 2023; Accepted 24 April 2023

Available online 25 April 2023

0269-7491/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Linking MS1 and MS2 signals in positive and negative modes of LC-HRMS in untargeted metabolomics using the ROIMCR approach

Flávia Yoshie Yamamoto^{1,2} · Carlos Pérez-López¹ · Ana Lopez-Antia¹ · Silvia Lacorte¹ · Denis Moledo de Souza Abessa² · Romà Tauler¹

Received: 5 June 2023 / Revised: 26 July 2023 / Accepted: 28 July 2023 / Published online: 17 August 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Data-independent acquisition (DIA) mode in liquid chromatography (LC) high-resolution mass spectrometry (HRMS) has emerged as a powerful strategy in untargeted metabolomics for detecting a broad range of metabolites. However, the use of this approach also represents a challenge in the analysis of the large datasets generated. The regions of interest (ROI) multivariate curve resolution (MCR) approach can help in the identification and characterization of unknown metabolites in their mixtures by linking their MS1 and MS2 DIA spectral signals. In this study, it is proposed for the first time the analysis of MS1 and MS2 DIA signals in positive and negative electrospray ionization modes simultaneously to increase the coverage of possible metabolites present in biological systems. In this work, this approach has been tested for the detection and identification of the amino acids present in a standard mixture solution and in fish embryo samples. The ROIMCR analysis allowed for the identification of all amino acids present in the analyzed mixtures in both positive and negative modes. The methodology allowed for the direct linking and correspondence between the MS signals in their different acquisition modes. Overall, this approach confirmed the advantages and possibilities of performing the proposed ROIMCR simultaneous analysis of mass spectrometry signals in their differing acquisition modes in untargeted metabolomics studies.

Keywords Untargeted metabolomics · All-ion fragmentation (AIF) · Positive and negative acquisition modes · Metabolite coverage improvement · ROIMCR, Regions of interest multivariate curve resolution

Introduction

New advances in OMICs techniques have increased the comprehension of biological mechanisms as responses to multiple disturbing factors affecting the health of the organisms [1–3]. In this context, the extensive analysis of metabolites represents a powerful approach to unveil new responses of organisms in diverse research fields, such as environmental sciences and clinical studies [4, 5]

Liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS), either with Orbitrap or time-of-flight (TOF) mass analyzers, represents one of the main choices for the analysis of metabolites in biological systems due to

its high sensitivity and specificity [6–8]. While a targeted approach allows the investigation of specific metabolites and potentially affected metabolic pathways, an untargeted analysis assesses a broader range of small molecules, identifying a greater number of affected metabolites and consequently exploring new affected pathways [9].

Regarding the ionization approach, electrospray ionization (ESI) allows the formation of positively or negatively charged ions depending on the polarity of the applied voltage. The particular physiochemical properties of each molecule may determine the most adequate ionization acquisition mode, with some presenting better ionization efficiency (IE) in the positive mode and others in the negative [10]. Most commonly, the acquisition is performed either in positive or negative ESI depending on the electronegativity, basicity, and size of the molecules to be analyzed [11], which may limit the identification of all constituents of biological systems if only one ionization mode is used.

The inherent large-sized complex dataset generated by the LC-HRMS, especially for data-independent acquisition (DIA) mode, is a great challenge for properly interpreting

✉ Romà Tauler
roma.tauler@idaea.csic.es

¹ Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

² Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil

the most relevant changes of treated organisms under an experimental condition. Different computer workflows have been proposed for extracting the significant signal features and their chemical assignment in LC-HRMS datasets [12–16]. The regions of interest multivariate curve resolution (ROIMCR) chemometrics approach is based on the bilinear model intrinsic data structure of the LC–MS data [7, 17–20] and represents an effective strategy for compressing and resolving data without losing relevant information and maintaining instrumental mass accuracy. Firstly, to reduce the dimensionality of the data matrices, the “regions of interest” (ROI) approach considers some parameters, such as signal intensity threshold, mass error tolerance, and a minimum number of detected occurrences [17, 21]. This initial “filtering” of the data selects the most relevant signals (features) and eliminates possible interferences and background noise generated by the equipment and solvents used. Following data compression, the resolution of the elution and spectra profiles of the chemical constituents in the analyzed mixtures can be achieved with the multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) method, as it has been extensively reported [22–25].

Within the untargeted metabolomics approach, our research group has recently shown for the first time the possible simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA raw data obtained by LC/Q-TOF by the ROIMCR approach for the identification of per- and poly-fluoroalkyl substances [20]. This new approach allows an improved linking of MS1 and MS2 DIA spectra of the resolved components by ROIMCR, i.e., linking the MS1 signals of the precursor ions with the MS2 signals of their fragment ions for every chemical compound of the analyzed sample. In this sense, a step forward in this approach is the simultaneous analysis of DIA acquisition in positive and negative modes, which has not yet been exploited. Therefore, in this work, we propose the simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA for both positive and negative modes, to increase the coverage of possible metabolites identified as well as to improve the efficiency of the data analysis procedures in untargeted metabolomics studies.

Material and methods

First, one synthetic standard mixture of amino acids was prepared and analyzed to set up the ionization and acquisition parameters to obtain higher sensitivity and accuracy by the developed LC/Q-TOF method. Then, 7 fish embryo replicates (*Rhamdia quelen*) were analyzed to comprehensively identify the amino acids’ signatures in the biological samples. For both situations, the simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA datasets for positive

and negative modes was attempted using the proposed ROIMCR approach.

Amino acid analytical standards

The amino acid standard solution containing 17 amino acids and ammonium chloride was purchased from Sigma Aldrich® (AAS18). The concentrated original solution of $2.5 \mu\text{M mL}^{-1}$ (except by L-cystine at $1.25 \mu\text{M mL}^{-1}$) was diluted ($5\times$ with 50:50 ACN/water) to reach a concentration of approximately $2 \mu\text{g/mL}$ (detailed information available in the Supplementary Material). Two internal standards, methionine sulfone (Sigma Aldrich®) and the 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES, Sigma Aldrich®), were prepared at a concentration of 1 mg/mL and were spiked at a final concentration of $1 \mu\text{g/mL}$.

Metabolites’ extraction in fish embryo samples

For the analysis of amino acids in biological samples, fish embryos (*Rhamdia quelen*) were obtained in the Panama Fish Farm (Paulo Lopes, Brazil) in March 2021 using the same procedures for fish breeding as described by Yamamoto et al. [26]. Amino acids and other metabolites were extracted from 7 pooled samples (approximately 50 mg of lyophilized embryos for each sample) according to the method proposed by Ortiz-Villanueva et al. [27] and are fully detailed in the Supporting Information.

LC/Q-TOF analysis

Analysis was performed using a UPLC/Q-TOF (Bruker Impact II). An Acquity UPLC BEH HILIC column ($2.1 \times 50 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$) from Waters™ was used to analyze amino acids and other metabolites in the standard solution and fish embryo extracted samples according to the protocol proposed by WATERS [28] with few modifications (Table S1 in Supporting Information). Acquisition ($\text{FSR} > 60,000$) was performed in full scan mass over 60 to 1000 m/z (Supporting Information Table S2). The ionization source operated in positive (4 eV of ion energy, 20–30 eV switching normalized collision energy) and negative mode (6 eV of ion energy, 24–36 eV switching normalized collision energy) alternating MS scans of the precursor ions (MS1) and all-ion fragmentation (MS2). Acquisitions in positive and negative ESI were performed in different chromatographic runs, as Bruker’s Q-TOF technology does not allow simultaneous acquisition in both modes. All solvents were analytical grade or higher purity.

Data analysis

LC/Q-TOF data obtained in the analysis of the amino acid standards and fish embryo samples were independently processed by the ROIMCR chemometric method [17, 22, 24, 29], which consists of a first step (regions of interest, ROI) to select the most relevant MS instrumental signals reducing the dimensionality of the data [21] followed by the application of the multivariate curve resolution (MCR) method according to Jaumot et al. [18] and Tauler [30] to resolve the elution and mass spectra profiles of the chemical

constituents of the analyzed samples. In this work, MS1 and MS2 data acquired independently (DIA) were simultaneously analyzed by ROIMCR either separately in positive (+) and negative (-) ionization modes or simultaneously, in MS1(+), MS1(-), MS2(+), and MS2(-) modes. The procedure has the following steps (Fig. 1).

Import of data

Firstly, the raw data obtained through the Bruker LC/Q-TOF were converted to a NetCDF data file (or mzXML files)

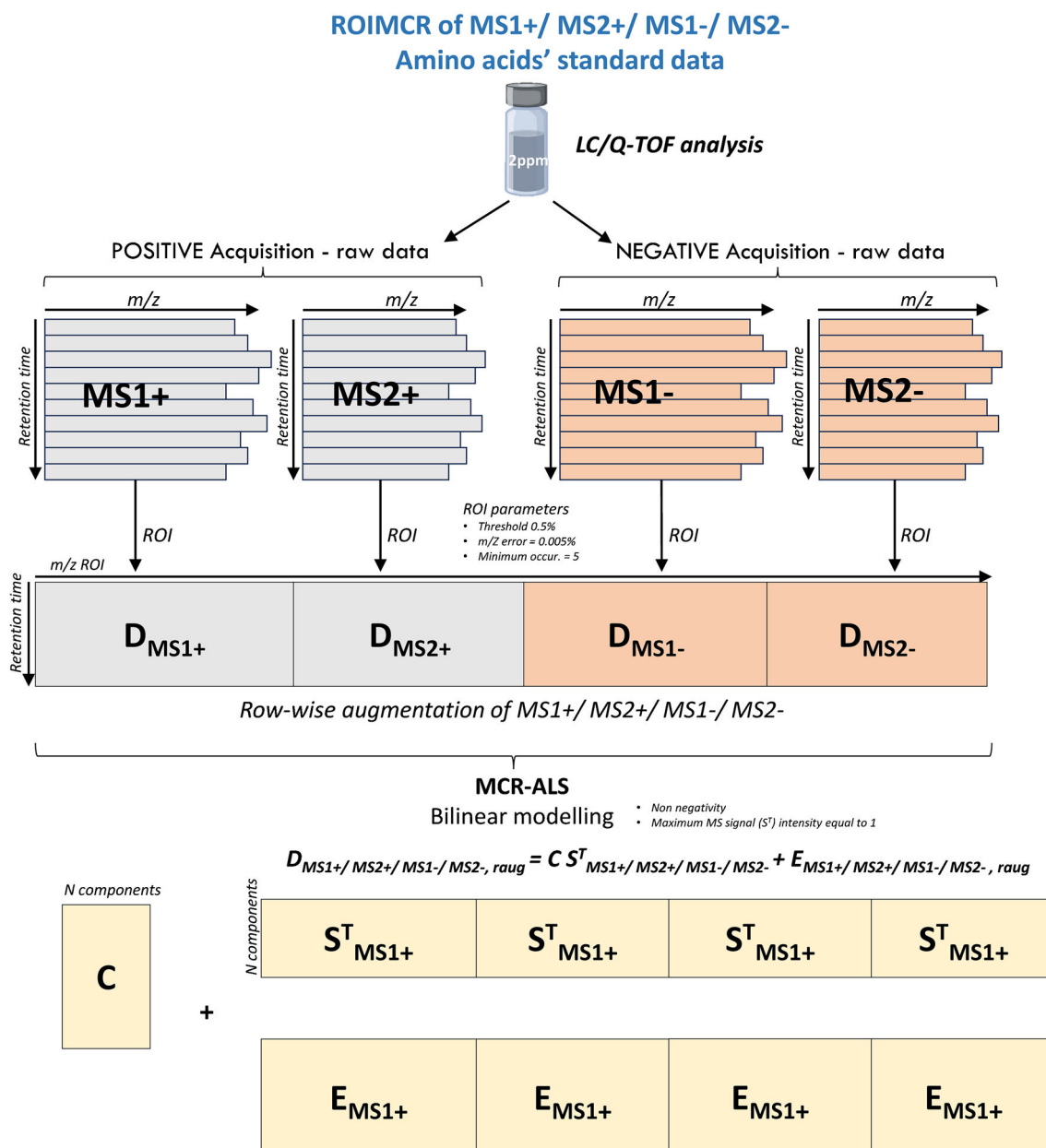


Fig. 1 Row-wise matrix augmentation and MCR bilinear model factor decomposition of MS1(+), MS2(+), MS1(-), and MS2(-) data acquired in the analysis of the amino acid standard mixture

through the Compass DataAnalysis software 5.2 (Bruker, Germany) and imported into MATLAB R2020a computing and visualization environment. This could be performed either using the MSroi app as described by Pérez-Cova et al. [21] in MATLAB or via mass spectrometry directly with the functions of the Bioinformatics toolbox (The Mathworks, Inc., 2020b).

The data from the amino acids' standard were imported using the MSroi GUI app as a single chromatographic run (single sample option) while the data from the 7 replicate fish embryo samples were imported as multiple chromatographic runs (using the multi-sample option) arranged as a column-wise augmented data matrix (see Fig. 1).

Regions of interest (ROI)

Before applying the ROI compression procedure to the NetCDF imported datasets, the MS1 and MS2 scans in positive (+) and negative (-) modes were separated, either for the analysis of the single sample (amino acid standards) or for the simultaneous analysis of the multiple fish embryo samples. After the data separation, ROI compression was performed separately for MS1(+), MS1(-), MS2(+), and MS2(-) datasets. Additionally, small parts of the chromatograms were cut by selecting only the time intervals of interest, disregarding the first 0.3 min (corresponding to the column dead volume) of the chromatographic run.

The ROI analysis generates a data matrix with a number of rows equal to the number of elution times and a number of columns equal to the number of MSROIs. This data matrix has the filtered MSROI data (following the parameters previously mentioned for each MS1 and MS2 dataset). The data matrices resulting from the ROI compression can be augmented row-wisely (horizontal concatenation) and be analyzed simultaneously in the two acquisition modes, the MS1 and the MS2 DIA data, at the same chromatographic retention times. This row-wise data matrix augmentation can be extended to include MS1 and MS2 DIA modes in both positive and negative ionization modes. An additional step for filtering those MSROIs with good elution profiles (through graphical visualization) was performed to improve the analysis before performing multivariate curve resolution, excluding those MSROIs with poor resolution, usually related to noise, also present in blank samples.

It is important to highlight that the row-wise matrix augmentation to analyze MS1 and MS2 DIA in positive and negative ionization modes requires that they are aligned to the same retention times. In other words, even if the acquisitions were performed in different chromatographic runs (as it occurred in the current study), the retention times between these datasets should be aligned as much as possible before the horizontal concatenation of the corresponding individual data matrices in the different acquisition modes. Therefore, MS signals were interpolated to match the chromatographic

retention times of the two acquisition modes before the horizontal concatenation of positive and negative MS signals.

Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS)

$$\mathbf{D}_{\text{MS}} = \mathbf{C} \mathbf{S}_{\text{MS}}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Previously arranged MSROI data matrices, $\mathbf{D}_{\text{MS}}$, were decomposed according to a factor decomposition bilinear model using MCR-ALS [18, 30] into the product of two-factor matrices with the elution profiles, $\mathbf{C}$, giving the relative concentrations of the compounds, and the MS spectra profiles, $\mathbf{S}^T$, giving the spectra with the MS signals and their m/z values, for the N selected components. Not explained variance is stored in the residuals/error data matrix, $\mathbf{E}$ (Eq. 1).

Components' spectra normalization was carried out as a constraint by MCR-ALS (spectra equal height) during the resolution of the components of the system. The mass spectra of every resolved component (potentially representing a chemical compound) have the MS1 and MS2 signals of the precursor and fragment ions, respectively, for each acquisition and ionization mode.

MCR can be performed separately for each chromatographic run using one acquisition and ionization mode or simultaneously using multiple chromatographic runs and acquisition, as described by Pérez-López et al. [20], and ionization positive and negative modes, as shown in the following Eqs. 2, 3, 4, and 5.

In the individual MCR-ALS analysis of a single chromatographic run by DIA MS1 and MS2 (Eq. 2), the horizontally concatenated data matrix $\mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}}$ is decomposed in the product of two-factor matrices, $\mathbf{C}$ and $\mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T$, related respectively with the concentration (elution) and with the horizontally concatenated (linked) MS1 and MS2 profiles of the chemical constituents present in the analyzed samples.

$$\mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}} = \mathbf{C} \mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T + \mathbf{E}_{\text{MS1,MS2}} \quad (2)$$

When multiple chromatographic runs are analyzed simultaneously, the different individual data matrices, $\mathbf{D}_{\text{MS}}$, can be concatenated vertically sharing the same spectral vector space, as shown in Eq. 3 for the case of concatenating chromatographic multi-run data matrices acquired in one of the two acquisition modes, either in positive or negative ionization.

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2,aug}} &= \begin{bmatrix} \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}} \\ \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}} \\ \dots \\ \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2,K}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \mathbf{C}_2 \\ \dots \\ \mathbf{C}_K \end{bmatrix} \mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1 \\ \mathbf{E}_2 \\ \dots \\ \mathbf{E}_K \end{bmatrix} \quad (3) \\ &= \mathbf{C}_{\text{aug}} \mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T + \mathbf{E}_{\text{MS1,MS2,aug}} \end{aligned}$$

where now $\mathbf{D}_{\text{MS1,MS2,aug}}$, $\mathbf{C}_{\text{aug}}$, and $\mathbf{E}_{\text{MS1,MS2,aug}}$ refer to the augmented vertically concatenated, concentration (elution

profiles), and residual/error matrices, when multiple MSROI data matrices coming from different chromatographic runs are simultaneously analyzed. And $S_{MS1, MS2}^T$ has as before the horizontally concatenated (linked) MS1 and MS2 profiles of the chemical constituents present in the analyzed samples.

These horizontal and vertical concatenations and MCR-ALS analysis can be also extended (introduced for the first time in this work) to the two possible ionization modes as shown in the following Eqs. 4 and 5

$$D_{MS1+, MS1-MS2-, MS2-} = C S_{MS1+, MS1-, MS2-, MS2-}^T + E_{MS1+, MS2+, MS1-, MS2-} \quad (4)$$

$$D_{MS1+, MS1+MS2-, MS2-, aug} = C_{aug} S_{MS1+, MS1-, MS2-, MS2-}^T + E_{MS1+, MS2+, MS1-, MS2-, aug} \quad (5)$$

In all these two equations, the C and C_{aug} concentration matrices, have the elution profiles of every component resolved by MCR-ALS in one of or in multiple chromatographic runs. From the peak areas or heights of the elution profiles resolved in C or C_{aug} , relative quantitative information on every resolved component can be obtained. This is especially useful in the case of multiple samples (chromatographic runs) simultaneously analyzed (in C_{aug}), for calibration purposes or semiquantitative estimations, in case of the absence of standards for quantification. With this information, the variation of the concentrations of the metabolites among different samples can be studied.

On the other hand, from the ion signals in the resolved mass spectra, $S_{MS1+, MS1-, MS2-, MS2-}^T$ horizontally concatenated and linked, the compound annotation or identification step is improved.

The complete data analysis workflow and the different types of data matrices concatenations and augmentations are displayed in Figs. 1 (augmentation of multiple acquisition and ionization modes of the amino acids' standard sample) and 2 (augmentation of multiple chromatographic runs at different acquisition and ionization modes for the fish embryo replicate samples).

The steps of the MCR-ALS analysis of the different MSROI data matrices are also given in the Supporting Information and have been described in previous papers [17, 18, 20, 22, 30].

Identification of the amino acids

The identification of the amino acids from the mass spectra profiles resolved by the MCR-ALS, both in the standard solution and in the fish embryo samples, was initially performed by directly checking if their m/z ROI values for precursor (MS1) and fragment (MS2) ions present in the MCR-ALS resolved mass spectra, $S_{MS1, MS2}^T$, were available

in public databases (Mass Bank, PubChem [31], accessed Nov-Dec/2022). To confirm the amino acid identity, a minimum mass error of 0.01 Da both for MS1 and MS2 values was considered. Mass measurement accuracy (average of individual mass errors) of 0.0017 Da was obtained for the positive acquisition mode and 0.0034 Da for the negative acquisition mode, and 0.0025 Da for the simultaneous analysis.

In addition, the identity of the amino acids verified by the ROIMCR approach was further confirmed using the Data Analysis from Bruker's MS software, and also the MS-DIAL software [14] by checking the reference-matched (MS1 and MS2 spectra were confirmed with literature databases if a total score > 850 in compound search information was found) and suggested ions (only MS1 spectra is confirmed). To do this, the raw MS data NetCDF files were converted to ABF format and the parameters were set with similar conditions to those used for the ROI analysis, with few modifications (intensity threshold of 1000, mass error of 0.01 Da, and other details given in the Table S3 in the Supporting Information) to increase the sensitivity of the analysis and consider more potential compounds, with milder filtering conditions.

Results and discussion

ROIMCR results and parameter selection

Significant reduction of the data dimensionality of the amino acid standard sample was achieved by selecting the following ROI parameters (Table 1): a signal intensity threshold of 5000 (the equivalent of 0.1% of maximum intensity), a mass error tolerance of 0.005 Da, and minimum occurrence of 5 scans. Similar parameters were used for the ROI analysis of fish embryo samples, except for the intensity threshold which was set to a higher value of 10,000 (0.5%) due to the increased size of the data for biological samples.

For the analysis of the amino acids' standards, 30 components were resolved by MCR-ALS (Supporting Table S4), while for the fish embryo samples, 100 components were resolved considering the elevated variety of features present in biological samples. Non-negativity constraints were applied to the elution and mass spectra profiles. All MCR-ALS analyses provided more than 99.5% of explained variance for both the amino acid standard and the fish embryo samples (see Supporting Table S4).

ROIMCR results in the analysis of the amino acid standard

The LC/Q-TOF method with the HILIC column used in this study represented a fast, simple, and effective strategy for separating and detecting the amino acids (Supporting Figure S1),

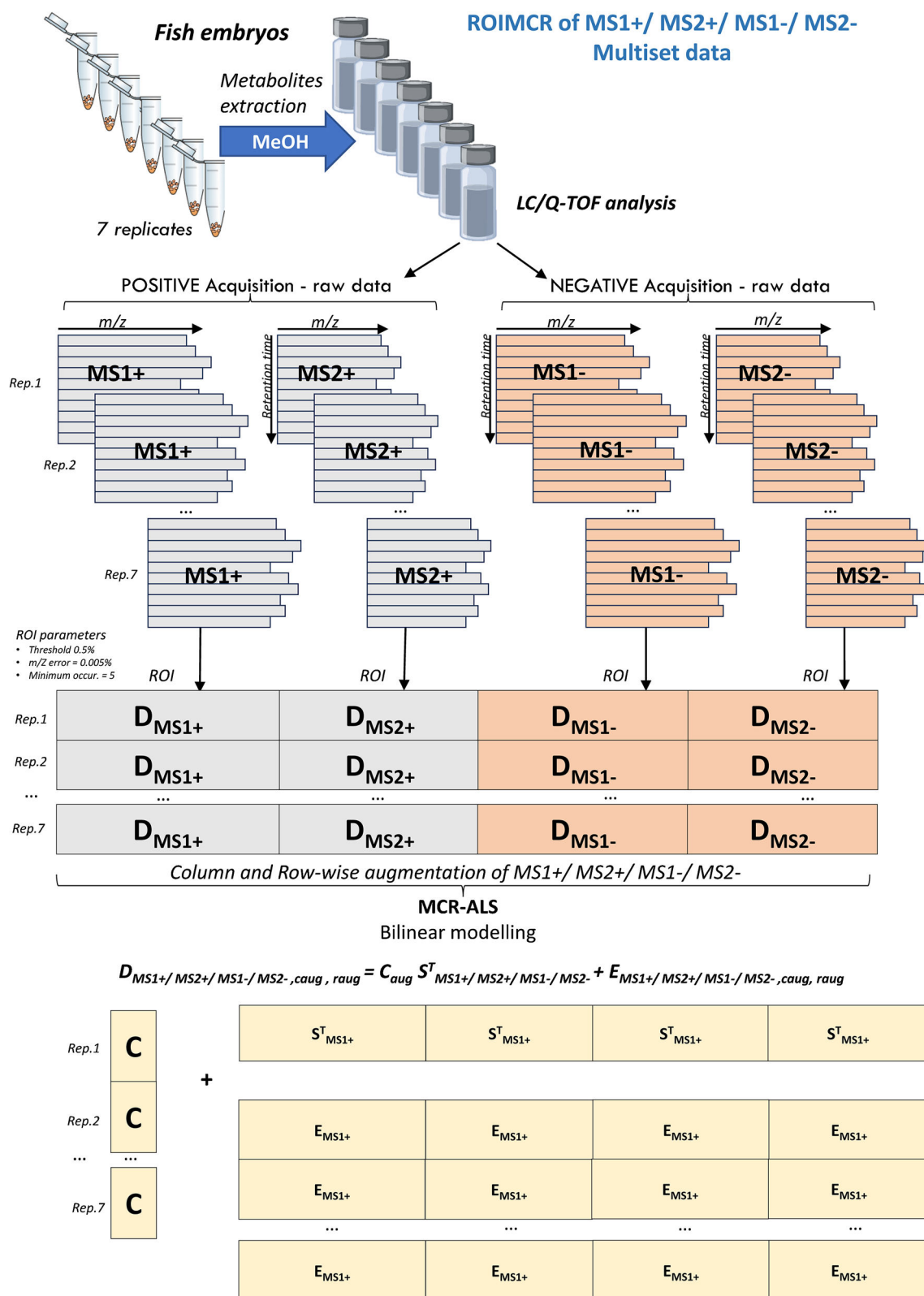


Fig. 2 Column- and row-wise matrix augmentation and MCR bilinear model factor decomposition of MS1(+), MS2(+), MS1(-), and MS2(-) data acquired in the analysis of multiple fish embryo sample replicates

Table 1 Regions of interest (ROI) parameters

Regions of interest (ROI) algorithm parameters		
	Aa standard mix	Fish embryo samples
Signal intensity threshold	5000 (~0.1%)	10,000 (~0.5%)
Factor signal ($\times$ threshold)	1	1
Mass error deviation	0.005	0.005
Mass units	Daltons	Daltons
m/z values calculation	Median	Median
Minimum occurrence	5	5

as reported by [32]. In addition, the ROIMCR approach solves the mixture analysis problem even in situations of strong compounds' coelutions, by improving the resolution of their elution profiles. Due to the selectivity of high-resolution MS signals, ROIMCR can separate the elution and spectra profiles of a large number of possible chemical constituents in complex biological and environmental samples [7, 19, 27, 29].

ROIMCR analysis allowed identifying all seventeen amino acids present in the standard mixture sample (see

Table 2 and Supporting Figure S2), as well as the two internal standards present in the sample. As expected, the most intense signals were observed at higher m/z values for MS1 when compared to MS2 for both acquisition modes.

Different signal intensities were obtained for the acquisitions in positive and negative modes for the different amino acids. When MS1 and MS2 DIA data in positive and negative ionization modes were analyzed separately (Eq. 2), distinct sets of fifteen amino acids were detected, with the L-proline and L-valine being detected only in the positive mode and the L-glycine and L-cystine only in the negative mode. In general, better ionization efficiency (higher intensity values) was obtained for the amino acids detected at the positive mode (average signal intensities of 928 and 117 units with 10 amino acids with the highest intensities, Table 2), than at the negative mode (average of signal intensities of 395 and 887). This is also illustrated in Supporting Figure S2 where higher peaks are observed for the elution profiles in positive mode. On the other hand,

Table 2 Parameters used for the detection of the seventeen amino acid standard solution and the two additional internal standards analyzed. Exact¹ and experimental² exact mass and their maximum height signal intensity values (arbitrary units)³ obtained at each ioni-

zation mode (positive and negative), and their chromatographic retention times⁴. The last column⁵ confirms (x) the detection of the amino acid (or internal standard) in the simultaneous data analysis of the positive and negative modes

Amino acids	Positive ionization			Negative ionization				
	[H ⁺] exact mass ¹	[H ⁺] exper. Mass ²	Intensity ³	[H ⁻] exact mass ¹	[H ⁻] exper. mass ²	Intensity ³	RT ⁴ (min)	Pos/neg ⁵
1 L-Phenylalanine	166.0868	166.0846	1,091,678	164.0712	164.0671	584,228	2.82	x
2 L-Isoleucine	132.1025	132.1007	1,562,956	130.0868	130.0837	223,230	2.89	x
3 L-Leucine	132.1025	132.1007	1,562,956	130.0868	130.0837	223,230	2.89	x
4 L-Tyrosine	182.0817	182.0793	441,574	180.0661	180.0616	677,328	2.99	x
5 L-Methionine	150.0589	150.0569	946,572	148.0432	148.0395	816,872	3.03	x
6 L-Valine	118.0868	118.0853	775,806	116.0712	ND	ND	3.24	x
7 <i>Methionine sulfone</i>	182.0487	182.0463	120,358	180.03305	180.0284	808,366	3.34	x
8 Glycine	76.03986	ND	ND	74.0242	74.0223	286,062	3.58	x
9 L-Threonine	120.0661	120.0645	95,528	118.0504	118.0474	919,562	3.58	x
10 <i>PIPES</i>	303.0684	303.0643	82,214	301.05281	301.0448	611,436	3.58	x
11 L-Proline	116.0712	116.0697	4,609,182	114.0555	ND	ND	3.61	x
12 L-Serine	106.0504	106.0492	38,116	104.0348	104.0322	813,598	3.72	x
14 L-Alanine	90.05551	90.0543	70,432	88.0399	88.0375	16,284	5.49	x
13 L-Glutamic acid	148.061	148.0592	96,378	146.0453	146.0415	617,628	4.00	x
15 L-Aspartic acid	134.0453	134.0438	8814	132.0297	132.0262	57,966	5.49	x
16 L-Arginine	175.1195	175.1174	2,055,464	173.1039	173.0992	195,606	6.14	x
17 L-Lysine	147.1134	147.1116	420,304	145.0977	145.0939	37,522	6.39	x
18 Cystine	241.0316	ND	ND	239.0160	239.0098	8722	6.49	*
19 L-Histidine	156.0773	156.0752	146,004	154.0616	154.0577	129,352	7.08	x

ND, non-detected amino acid in one mode of acquisition

*Non-detected amino acid due to its poor ionization in both modes of acquisition under tested conditions

Italic font - Metabolites used as internal standards

Bold values - Highest intensity values for one of the acquisition modes

both internal standards showed higher signal intensities in negative mode.

According to the literature, the ionization of amino acids is mostly operated in the positive mode due to their higher ionization efficiency [11, 32, 33]. But alternatively, in some cases, it gives also good results in negative acquisition [34]. Liigand et al. [10] reported better ionization energy in the negative mode for 33 compounds that ionize in both modes, including amino acids. The amino acids' inherent amphoteric property allows functional groups to either receive or donate protons, therefore having a zwitterionic form. Indeed, their different physiochemical properties determine their different ionization efficiencies [32]. When MS1 and MS2 DIA data in both positive and negative ionization modes were simultaneously analyzed (Eq. 4) by the ROIMCR, all amino acids (except for cysteine due to its poor ionization in both modes under tested conditions) present in the amino acid standard mixture were properly detected and resolved.

Even so, this evidences the relevance and advantages of this method, since for instance, the single analysis in positive mode could have missed the detection of the glycine, while in negative mode could have missed the identification of valine and proline.

Figure 3 gives, as an example, the elution and spectra profiles of two different amino acids (L-phenylalanine and L-proline) detected in MS1 and MS2 DIA in simultaneous data analysis of positive and negative acquisition modes (TIC, total ion chromatograms are shown in Figure S1 in the Supporting Information). Apart from their molecular formulas, MS1 and MS2 major ions in positive and negative modes obtained from their respective ROIMCR resolved spectra in the four modes, MS1(+)/MS2(+)/MS1(-)/MS2(-), are given, as well as their elution profiles plotted for the number of scans or with respect to the retention times in the *x*-axis. In this case, as expected, L-phenylalanine elutes earlier (169.3 s) than L-proline (217.1 s). This is explained by the lower polarity of the former when compared with the latter. For both amino acids, higher ionization efficiencies were observed in the positive acquisition mode as reflected in the different scales of the *y*-axis of the resolved mass spectra. In the four cases (MS1(+), MS2(+), MS1(-), MS2(-) signals), their values were scaled to their maximum signal intensity value equal to 1, which was achieved for MS1 in positive mode for both L-phenylalanine and L-proline. In fact, the latter did not give a significant MS⁻ signal. The annotation of the different amino acids can be potentially enhanced using the correspondent link between the main precursor ions in positive (protonated ion [H⁺]) and negative (deprotonated ion [H⁻]) modes, differing approximately 2.01 *m/z* units. Thus, the proposed ROIMCR allows the direct linking and correspondence between the MS signals in the four acquisition modes (MS1(+)/MS2(+)/MS1(-)/MS2(-)), for the same chemical species (see Tables 2 and S5), when performing their simultaneous analysis. Linking the spectra of the different amino acids in their four acquisition modes facilitates their

coverage, identification, and possible quantitation [20]. Table S5 (in Supplementary Information) describes the list of MS2 fragment ions obtained in the ROIMCR analysis, confirmed by the literature database, that facilitated the annotation and identification of the amino acids in the standard sample.

ROIMCR results in the analysis of the fish embryo samples

After confirming the detection of the amino acids in their standard mixtures, their presence in the fish embryo samples was analyzed using the ROIMCR approach. Similarly to the pattern observed for the amino acids' standard, it was possible to observe a better ionization efficiency in the positive mode, with more ROI signals of higher intensity being obtained in this acquisition mode when compared to the negative mode (Table 2, Supporting Figure S3). All seven replicates in each acquisition mode gave relatively similar elution profiles. Higher intensity signals were obtained for MS1 ions in comparison to MS2 ion fragments.

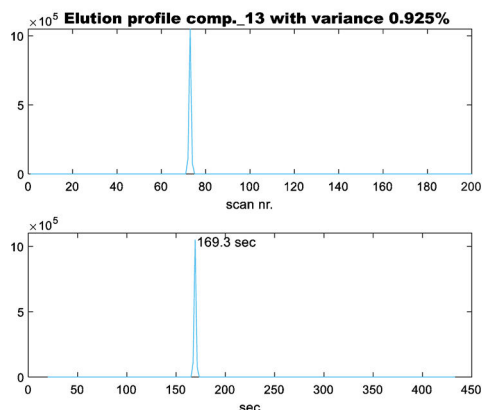
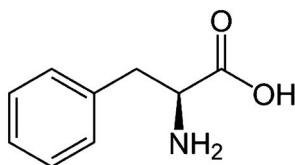
In Fig. 4, ROIMCR results are shown for the resolution of L-threonine (up) and L-valine (down) amino acids in the analysis of the seven different embryo samples. As in Fig. 3, *m/z* values of the major MS signals for the two amino acids are given for the different acquisition and ionization modes, which agree with those expected for these two amino acids (see Table 2). Whereas L-threonine gave significant signals at the four acquisition and ionization modes, L-valine was giving MS signal only in positive ionization, for both MS1 and MS2 DIA acquisition modes.

In the upper subplot for L-threonine and the lower subplot for L-valine, the seven elution profiles obtained by ROIMCR in the resolution of the seven embryo replicate samples are shown giving good peak shapes. The reproducibility of these peaks indicates the adequacy of the analytical procedure and the correct ROIMCR resolution of these two amino acids in the different fish embryo samples analyzed with only some small differences in the height and peak areas (also in the two subplots below). In the overlaid elution profiles plot also given in the two subplots, proper peak alignment and shapes among the elution profiles of both amino acids were achieved. Finally, on the right side of the two subplots, the spectra profiles of the amino acid show the MS1 and MS2 DIA signals for the two ionization modes. Whereas for L-threonine, MS1 and MS2 DIA signals were recorded in the four acquisition and ionization modes, and no MS signal was obtained for valine in the negative mode due to its poorer ionization at the conditions of this work.

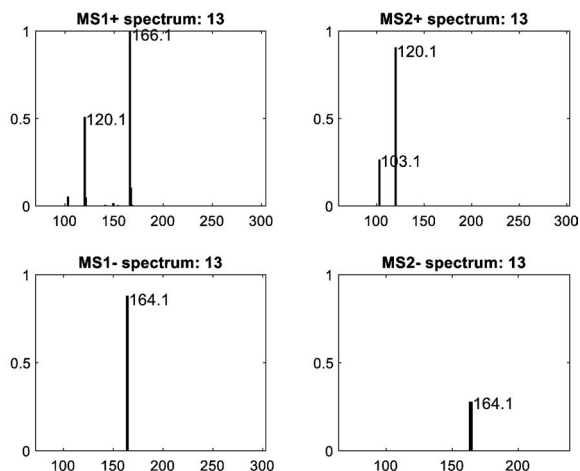
In traditional analytical work, a broad assessment of multiple classes of compounds usually requires two separate analyses in positive and negative modes, and the optimization of chromatographic conditions [34, 35]. Even when both ionization modes are measured simultaneously (using switching acquisition), the data analysis is usually performed separately

L-Phenylalanine

(Aromatic side-chains)

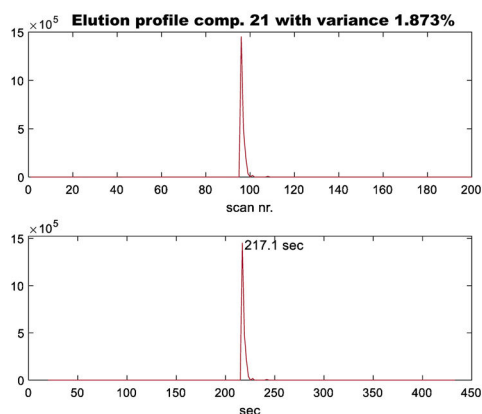
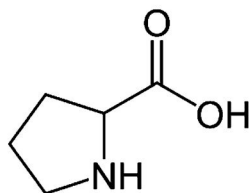


<i>m/z</i>	Positive	Negative
MS1	166.08680	164.0671
MS2	120.0796/ 103.0533	147.041



L- Proline

(Aliphatic side-chains)



<i>m/z</i>	Positive	Negative
MS1	116.0711	-
MS2	70.065	-

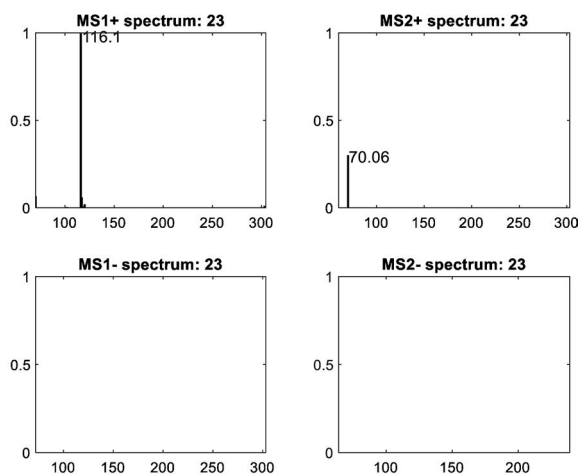
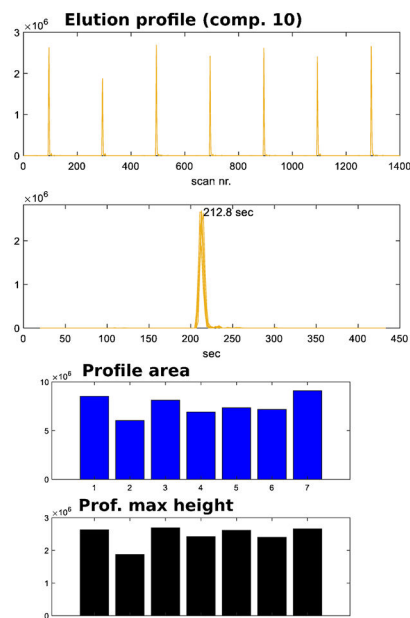


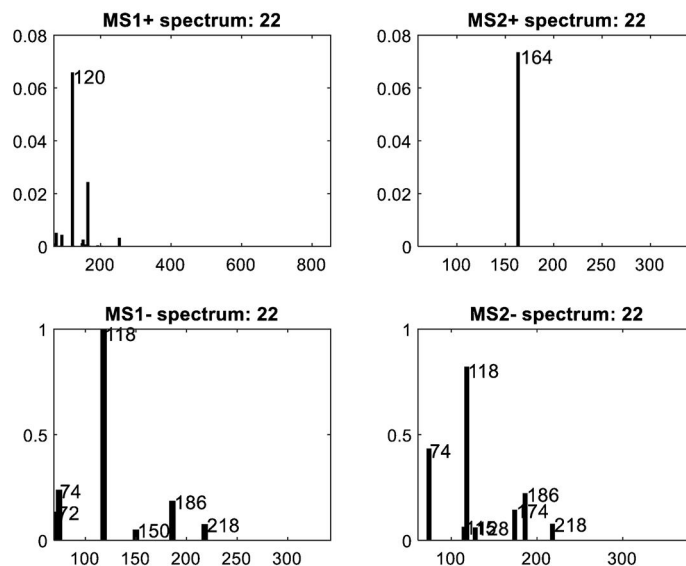
Fig. 3 Elution and spectra profiles of two different amino acids (L-phenylalanine and L-proline) resolved by ROIMCR simultaneous analysis of MS and MS/MS DIA data in positive and negative acquisition modes. Left panels: molecular formula of the identified amino acid (upper), ROIMCR elution profiles of the amino acid vs scan

number (middle), and vs retention time (lower). Right panels: list of *m/z* values with more significant MS1 and MS2 signals (upper), and MS1(+), MS2(+), MS1(-), and MS2(-) ROIMCR resolved spectra profiles with the *m/z* values of their more intense signals (lower)

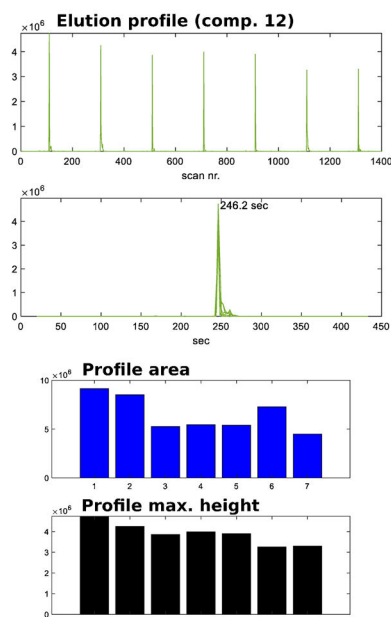
L-Threonine



<i>m/z</i>	Positive	Negative
MS1	120.0660	118.0504
MS2	70.065	74.02232



L-Valine



<i>m/z</i>	Positive	Negative
MS1	118.0868	
MS2	72.0802	

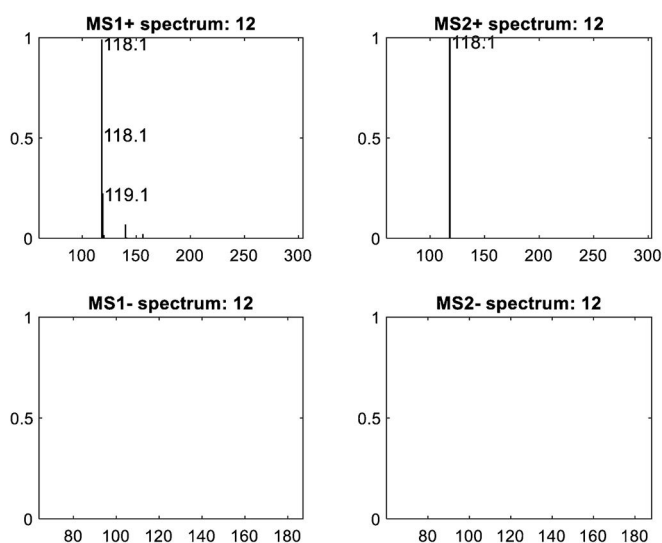


Fig. 4 Elution and spectra profiles of two different amino acids (L-threonine and L-valine) detected in the fish embryo samples, resolved by the ROIMCR simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA data in positive and negative acquisition modes. Left panels: ROIMCR elution profiles of the amino acid vs scan number (upper),

vs retention time (middle), and their peak areas and maximum heights for each sample analyzed. Right panels: MS1 and MS2 signals (upper) and MS1(+), MS2(+), MS1(-), and MS2(-) (lower) signals of the ROIMCR resolved spectra profiles giving the *m/z* values of their more intense signals

for some specific ions and m/z values [36, 37]. In contrast, the possible simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA signals in positive and negative modes, as demonstrated in this work, can increase the number of simultaneously detected compounds with broader chemical coverage and diversity, optimizing efforts in a shorter time. Moreover, the identification steps are extremely facilitated with the direct links established between precursor ions (in MS1) and fragment ions (in MS2 DIA) and with different signals in the two ionization modes. The suitability of the ROIMCR concept associated with the bilinear factor decomposition of both MS1 and MS2 signals arranged in a single matrix has been recently shown by Pérez-López et al. [20], which is extended now in this work with the inclusion of MS1 and MS2 signals in both ionization modes.

In addition, the comparison of ROIMCR results with those obtained using the MS-DIAL method [14, 38, 39] has confirmed the identity of the seventeen amino acids and the two internal standards, with their corresponding m/z values in MS1 and MS2 DIA and with matched retention times. Since MS-DIAL does not allow performing the simultaneous analysis of the positive and negative ionization modes, it was necessary to perform the ion search separately. For the positive mode, MS-DIAL identified the presence of thirteen amino acids detected in the fish embryo samples (reference matched, total score > 850) and the presence of L-threonine and L-aspartate as suggested ions (only MS1 spectra confirmed). On the negative mode, fewer amino acids were identified as reference-matched ions (both MS1 and MS2 spectra confirmed with databank). MS-DIAL only detected five amino acids with a good reference match, and other eight ions were suggested. For both positive and negative modes, the surrogate methionine sulfone was also found as a reference-matched metabolite as well as the internal standard PIPES as a suggested ion. Although MS-DIAL is a well-recognized method that greatly facilitates compound searching, it requires the separated analysis of the MS signals in the two ionization modes.

Conclusions

Results obtained in this study showed for the first time the suitability of the simultaneous data analysis of MS1 (+)/MS2 (+)/MS1 (-)/MS2 (-) signals using the ROIMCR approach in the analysis of a standard mixture of amino acids in solution and fish embryo extracts. Comparison of results obtained in the simultaneous analysis of all acquisition (MS1 and MS2) and ionization (positive and negative) data modes with the results obtained in the individual separate analysis of the different acquisition and ionization modes showed that time efforts and metabolite coverage can be improved in the simultaneous analysis. The link established between the different MS1 +, MS2 +, MS1-, and MS2- acquisitions and ionizations for the same

chemical compound greatly facilitates the identification of the metabolites present in the analyzed samples. The identification of the amino acids in the fish embryo samples by the proposed ROIMCR method has confirmed the reliability of the proposed strategy for untargeted metabolomics analysis. The approach proposed in this work is an important improvement in the context of the rapid growth of untargeted types of analysis using data-independent acquisition modes. This study encourages further metabolomic investigations using the ROIMCR-described approach combining different MS ionization and acquisition modes.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04893-3>.

Acknowledgements The authors acknowledge the financial support from the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (MINECO) for project PID2019-105732GB-C21 and Yamamoto F.Y. thanks the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) through the research grant Process 2020/14688-8. IDAEA-CSIC is a Center of Excellence Severo Ochoa (Spanish Ministry of Science and Innovation, Project CEX2018-000794-S).

Additionally, the authors would like to thank for the kind assistance of Roser Chaler Ferrer and Alexandre Garcia Barrera from the Mass Spectrometry-Special Techniques Service (IDAEA-CSIC), as well as all the support from the staff of the Chemometrics Research Group (in special: Aina Queral, Carmen B. Girbés, Marc M. García, Jaume B. Grau, Joaquim Jaumot, Bernat O. Nolla, and Miriam C. Perez Cova).

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

Declarations

Ethics approval This study had the approval from the Ethics Committee for the use of animals from the São Paulo State University (Protocol 12/2018-CEAUA) and the experimental conditions complied with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, law 11.794/2008). The biological material was obtained by the Panama Fish Farm (Paulo Lopes, Brazil) <https://www.pisciculturapanama.com.br/>.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. Omics technology. Molec Diagn: Promises Possibilities. 2010;11–31. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_2.

2. Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 2017;2017(18):1–15. <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1215-1>.
3. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: technologies and their applications. *J Chromatogr Sci.* 2017;55:182–96. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.
4. Bouhifd M, Hartung T, Hogberg HT, Kleensang A, Zhao L. Review: Toxicometabolomics. *J Appl Toxicol.* 2013;33:1365–83.
5. Koelmel JP, Napolitano MP, Ulmer CZ, Vasiliou V, Garrett TJ, Yost RA, Prasad MNV, Godri Pollitt KJ, Bowden JA. Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. *Metabolomics.* 2020;16:1–22. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01665-3>.
6. Martín-Blázquez A, Díaz C, González-Flores E, Franco-Rivas D, Jiménez-Luna C, Melguizo C, Prados J, Genilloud O, Vicente F, Caba O, Pérez del Palacio J. Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Sci Rep.* 2019;9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55952-8>.
7. Ortiz-Villanueva E, Benavente F, Piña B, Sanz-Nebot V, Tauler R, Jaumot J. Knowledge integration strategies for untargeted metabolomics based on MCR-ALS analysis of CE-MS and LC-MS data. *Anal Chim Acta.* 2017;978:10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.049>.
8. Rochat B, Mohamed R, Sottas PE. LC-HRMS metabolomics for untargeted diagnostic screening in clinical laboratories: a feasibility study. *Metabolites.* 2018;8:1–17. <https://doi.org/10.3390/metab08020039>.
9. Salihovic S, Broeckling CD, Ganna A, Prenni JE, Sundström J, Berne C, Lind L, Ingelsson E, Fall T, Ärnlov J, Nowak C (2020) Non-targeted urine metabolomics and associations with prevalent and incident type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2020;10:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72456-y>.
10. Liigand P, Kaupmees K, Haav K, Liigand J, Leito I, Girod M, Antoine R, Krue A. Think negative: finding the best electrospray ionization/MS mode for your analyte. *Anal Chem.* 2017;89:5665–8. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B00096/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-000969_0003.JPEG.
11. Mak J, Cowan TM, Le A. Quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2019;2030:85–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1_8.
12. Verhoeven A, Giera M, Mayboroda OA. Scientific workflow managers in metabolomics: an overview. *Analyst.* 2020;145:3801–8. <https://doi.org/10.1039/D0AN00272K>.
13. Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H, Okahashi N, Yamada Y, Tada I, Bonini P, Higashi Y, Okazaki Y, Zhou Z, Zhu ZJ, Koelmel J, Cajka T, Fiehn O, Saito K, Arita M. Arita M (2020) A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nat Biotechnol.* 2020;38(10):1159–63. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2>.
14. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, Vanderghelynst J, Fiehn O, Arita M (2015) MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.* 2015;12(6):523–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>.
15. Lynn KS, Cheng ML, Chen YR, Hsu C, Chen A, Lih TM, Chang HY, Huang CJ, Shiao MS, Pan WH, Sung TY, Hsu WL. Metabolite identification for mass spectrometry-based metabolomics using multiple types of correlated ion information. *Anal Chem.* 2015;87:2143–51. <https://doi.org/10.1021/ac503325c>.
16. Xiao JF, Zhou B, Ransom HW. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Anal Chem.* 2012;32:1. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.08.009>.
17. Gorrochategui E, Jaumot J, Tauler R. ROIMCR: a powerful analysis strategy for LC-MS metabolomic datasets. *BMC Bioinformatics.* 2019;20:1–17. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-2848-8/FIGURES/6>.
18. Jaumot J, de Juan A, Tauler R. MCR-ALS GUI 2.0: new features and applications. *Chemom Intell Lab Syst.* 2015;140:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>.
19. Bayat M, Marín-García M, Ghasemi JB, Tauler R. Application of the area correlation constraint in the MCR-ALS quantitative analysis of complex mixture samples. *Anal Chim Acta.* 2020;1113:52–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.057>.
20. Pérez-López C, Oró-Nolla B, Lacorte S, Tauler R. Regions of interest multivariate curve resolution liquid chromatography with data-independent acquisition tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2023. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.2C05704>.
21. Pérez-Cova M, Bedia C, Stoll DR, Tauler R, Jaumot J. MSroi: a pre-processing tool for mass spectrometry-based studies. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2021;215. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104333>.
22. De Juan A, Jaumot J, Tauler R. Multivariate curve resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Anal Methods.* 2014;6:4964–76. <https://doi.org/10.1039/c4ay00571f>.
23. Marçó PH, Valderrama P, Alexandrino GL, Poppi RJ, Tauler R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: Descrição, funcionamento e aplicações. *Quim Nova.* 2014;37:1525–32.
24. Tauler R, Gorrochategui E, Jaumot J, Tauler R. A protocol for LC-MS metabolomic data processing using chemometric tools. *Protoc Exch.* 2015;1–28. <https://doi.org/10.1038/protex.2015.102>.
25. Tauler R. Multivariate curve resolution of multiway data using the multilinearity constraint. *J Chemom.* 2021;35:1–24. <https://doi.org/10.1002/cem.3279>.
26. Yamamoto FY, Souza ATC, de Paula V de CS, Beverari I, Garcia JRE, Padial AA, de Souza Abessa DM. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Sci Total Environ.* 2022;846:157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>.
27. Ortiz-Villanueva E, Jaumot J, Martínez R, Navarro-Martín L, Piña B, Tauler R. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Sci Total Environ.* 2018;635:156–66. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>.
28. WATERS. Gradient separation of amino acids on ACQUITY UPLC BEH HILIC | Waters. In: Application Note WA60134. 2009. <https://www.waters.com/nextgen/en/library/application-notes/2009/gradient-separation-of-amino-acids-on-acquity-uplc-beh-hilic.html>. Accessed 10 Jan 2023.
29. Gorrochategui E, Jaumot J, Lacorte S, Tauler R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2016;82:425–42. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>.
30. Tauler R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom Intell Lab Syst.* 1995;30:133–46. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00047-X).
31. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Tanaka K, Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom.* 2010;45:703–14. <https://doi.org/10.1002/JMS.1777>.
32. Violi JP, Bishop DP, Padula MP, Steele JR, Rodgers KJ. Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a tutorial review. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020;131:116018. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.116018>.
33. Liu Z, Tu MJ, Zhang C, Jilek JL, Zhang QY, Yu AM. A reliable LC-MS/MS method for the quantification of natural amino acids in mouse plasma: method validation and application to

- a study on amino acid dynamics during hepatocellular carcinoma progression. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019;1124:72. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.05.039>.
34. Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morla A, Bouchu D. ESI-MS/MS analysis of underivatised amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17:1297–311. <https://doi.org/10.1002/RCM.1054>.
35. Bang DY, Lim S, Moon MH. Effect of ionization modifiers on the simultaneous analysis of all classes of phospholipids by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion mode. *J Chromatogr A.* 2012;1240:69–76. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.03.073>.
36. Yang Z, Anacleto J, Maljers L. Positive-negative switching LC–MS–MS for quantification of pesticides in juice. *Column.* 2014;10:9428–35. <https://doi.org/10.1021/JF503468T>.
37. Dey AS, Ayon NJ, Bhattacharya C, Gutheil WG, Mukherji M. Positive/negative ion-switching-based LC–MS/MS method for quantification of cytosine derivatives produced by the TET-family 5-methylcytosine dioxygenases. *Biol Methods Protoc.* 2020;5:1–9. <https://doi.org/10.1093/BIOMETHODS/BPAA019>.
38. Tada I, Tsugawa H, Meister I, Zhang P, Shu R, Katsumi R, Wheelock CE, Arita M, Chaleckis R. Creating a reliable mass spectral–retention time library for all ion fragmentation-based metabolomics. *Metabolites* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/metabo9110251>.
39. Lai Z, Tsugawa H, Wohlgemuth G, Mehta S, Mueller M, Zheng Y, Ogiwara A, Meissen J, Showalter M, Takeuchi K, Kind T, Beal P, Arita M, Fiehn O (2017) Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods.* 2017;15(1):53–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>.
40. OECD. Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing 2013;1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Scientific Report of the Research Internship Abroad (BEPE-FAPESP)

Title: Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental chemicals from Doce River in brazilian fish embryos

PD candidate: **Flávia Yoshie Yamamoto**

Supervisor: Denis Moledo S. Abessa

Host Supervisor: Romà Tauler Ferré

Institution: Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA), Barcelona, Spain

Process number: 2020/14688-8

Period of activities: 04/01/2023 – 30/12/2023

Original Abstract

Mining activities have a long history of impacting aquatic environments, such as the Doce River Basin (DRB), in Brazil. After the collapse of the Fundão dam (MG), high concentrations of metals in water and sediments from DRB were reported, and some remain above legal standards even after 4 years. Wastewater, industrial effluents, and pesticide runoff from agricultural landscapes have released organic chemicals into this waterbody, resulting in complex mixtures with metals. No previous study has investigated the co-occurrence of organic contaminants and their potential toxicological effects in the DRB. Besides, their mechanisms of toxicity in aquatic organisms are obscure, making it difficult to distinguish effects triggered by organic contaminants from those induced by metals. For unveiling mechanisms of toxicity, LC-HRMS metabolomics can be a powerful approach in field-scale monitoring studies, helping to comprehend biological responses to environmental stressors. This study aims to investigate mechanisms of toxicity of environmental chemicals from DRB using a comprehensive untargeted LC-HRMS metabolomics approach in fish embryos (*Rhamdia quelen*) exposed to chemical mixtures, in order to distinguish responses induced by inorganic and organic chemicals. Fish embryos will be exposed for 96h to 6 treatment groups, considering mixtures of inorganic chemicals (same concentrations detected in DRB), organic chemicals extracted from sediments from DRB and complex mixtures of both inorganic and organic chemicals. Exposures will occur in Brazil and samples will be transported to Spain for LC-HRMS analysis to elucidate mechanisms of toxicity, including oxidative stress and possible endocrine disruption pathways. The results will help to identify and distinguish effects of different classes of environmental chemicals when combined as complex mixtures, not only in the DRB but also in other aquatic ecosystems.

Keywords: Doce River, metals, organic contaminants, mixtures, metabolomics, fish embryos

Activities performed during the period of the internship

1. Participation in scientific events

Date	Event	Presentation	FAPESP Financial Support
15-19/ 05/2022	SETAC Europe 32nd Annual Meeting (Copenhagen, DE)	<i>Exploring chemical and biological data to understand the impacts of the pollutants in the Doce river, Brazil, after the mining dam collapse (Poster)*</i>	YES
10-11/ 10/2022	18th Annual Workshop On Emerging High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) And LC-MS/MS Applications In Environmental Analysis And Food Safety (Barcelona, ES)	<i>LC-HRMS-based metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental chemicals from Doce River in brazilian fish embryos (Poster)*</i>	NO

**Certificates are shown attached at the end of the document.*

2. Experimental work

The work performed during the Research Internship abroad can be divided into different chapters related to metabolomics approaches with potential publication of three different papers:

- 1- *Simultaneous data analysis of LC-HRMS DIA in positive and negative modes using the ROIMCR approach for the identification of amino acids in untargeted metabolomics (first draft written, complete version with a first round of revision, Figure 1) – to be submitted in Analytica Chimica Acta (or Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems)*
- 2- *Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental complex mixtures from Doce River in brazilian fish embryos (first draft written, incomplete version missing conclusion of discussion, Figure 2) – to be submitted in Environmental Science and Technology Journal*
- 3- *Simultaneous detection and identification of multiple metabolites standards as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics (data analysis complete, draft not written, Figure 3).*

This report will briefly introduce the methodology used for each chapter, followed by their full description with the last version of the manuscript drafts.

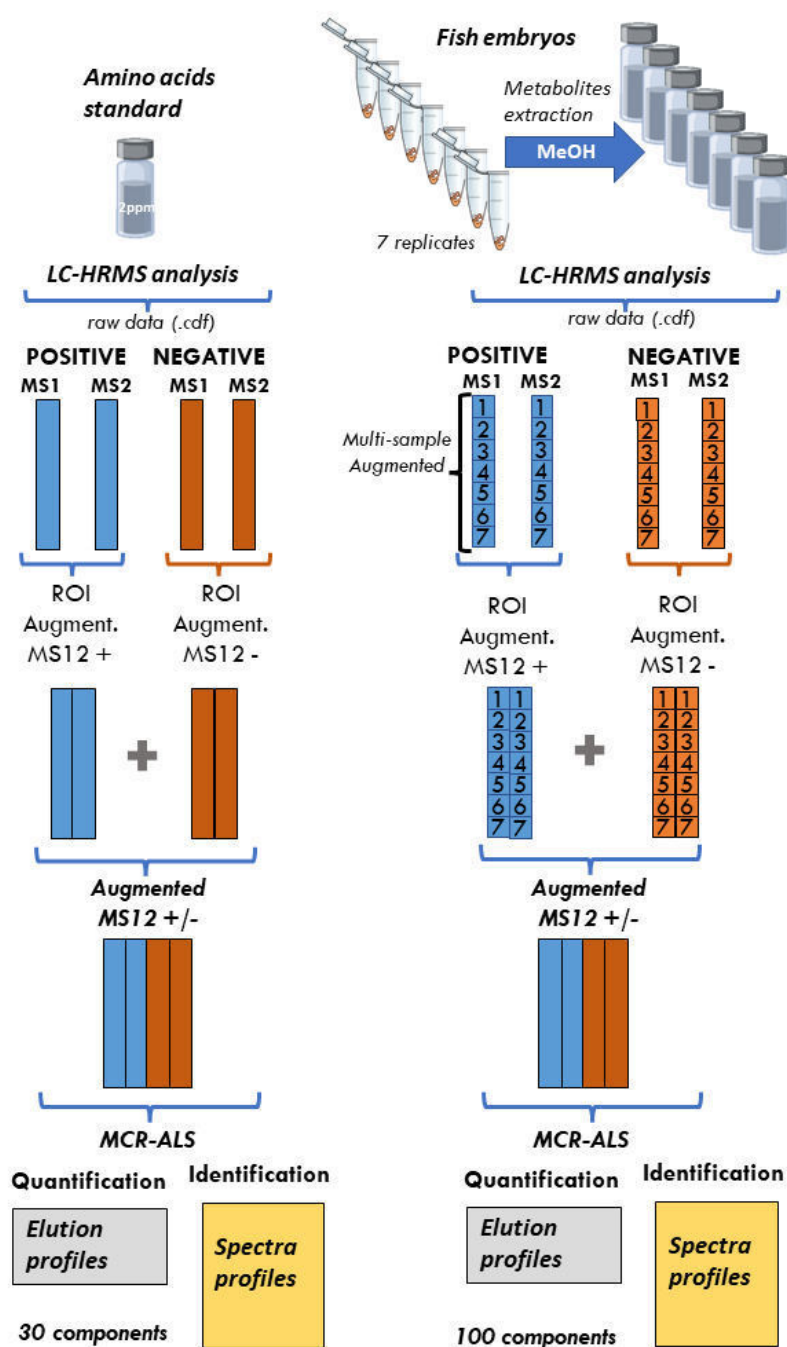
Paper 1. *Simultaneous data analysis of LC-HRMS DIA in positive and negative modes using the ROIMCR approach for the identification of amino acids in untargeted metabolomics*

Abstract

The data-independent acquisition mode (DIA) in the LC-HRMS approach has emerged as a powerful strategy in untargeted metabolomics for detecting a broader range of metabolites, even at lower concentrations, and allowing the discovery of new biomarkers. Despite the inherent large-sized complex datasets generated by DIA, our research group has recently shown the possible simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA raw data by the ROIMCR approach, linking their signals for every feature, greatly assisting in their further identification process. In this work we propose a step forward in this approach with the simultaneous analysis of DIA in positive and negative modes of ionization, which has not yet been exploited, to increase the coverage of possible metabolites identified as well as to improve the efficiency of the data analysis procedures in unsupervised metabolomics studies. For this, we performed the unsupervised data analysis of amino acids in positive and negative modes (separately and simultaneously) in a standard mixture solution of amino acids and fish embryo samples, independently processed by the ROIMCR chemometric method. The ROIMCR analysis allowed us to identify all the amino acids in the standard mixture and the fish embryo samples, with different ionization efficiencies obtained for the positive and negative modes when analyzed separately. The simultaneous data analysis of the positive and negative modes by the ROIMCR gave a similar result, showing the detection and identification of all amino acids, except by Cystine due to its poor ionization. Overall, the most outstanding result of this methodology was that it allowed the direct linking and correspondence between the MS signals in the four acquisition modes (MS1(+)/MS2(+)/MS1(-)/MS2(-)), for the same chemical species. This indicated the advantages and possibilities of performing the proposed simultaneous analysis of the different acquisition and ionization modes in the LC-HRMSMS analysis, facilitating considerably their coverage, identification, and efficiency of the data analysis procedures.

Keywords: Unsupervised metabolomics; all ions fragmentation; ionization efficiency; metabolites coverage improvement; Multivariate Curve Resolution

Figure 1. Workflow of the ROIMCR analysis for the identification of amino acids in standard solution or fish embryo samples, through arranged datasets of positive and negative modes of ionization. For each mode of acquisition, both MS1 and MS2 datasets are also combined to facilitate the identification of the features.



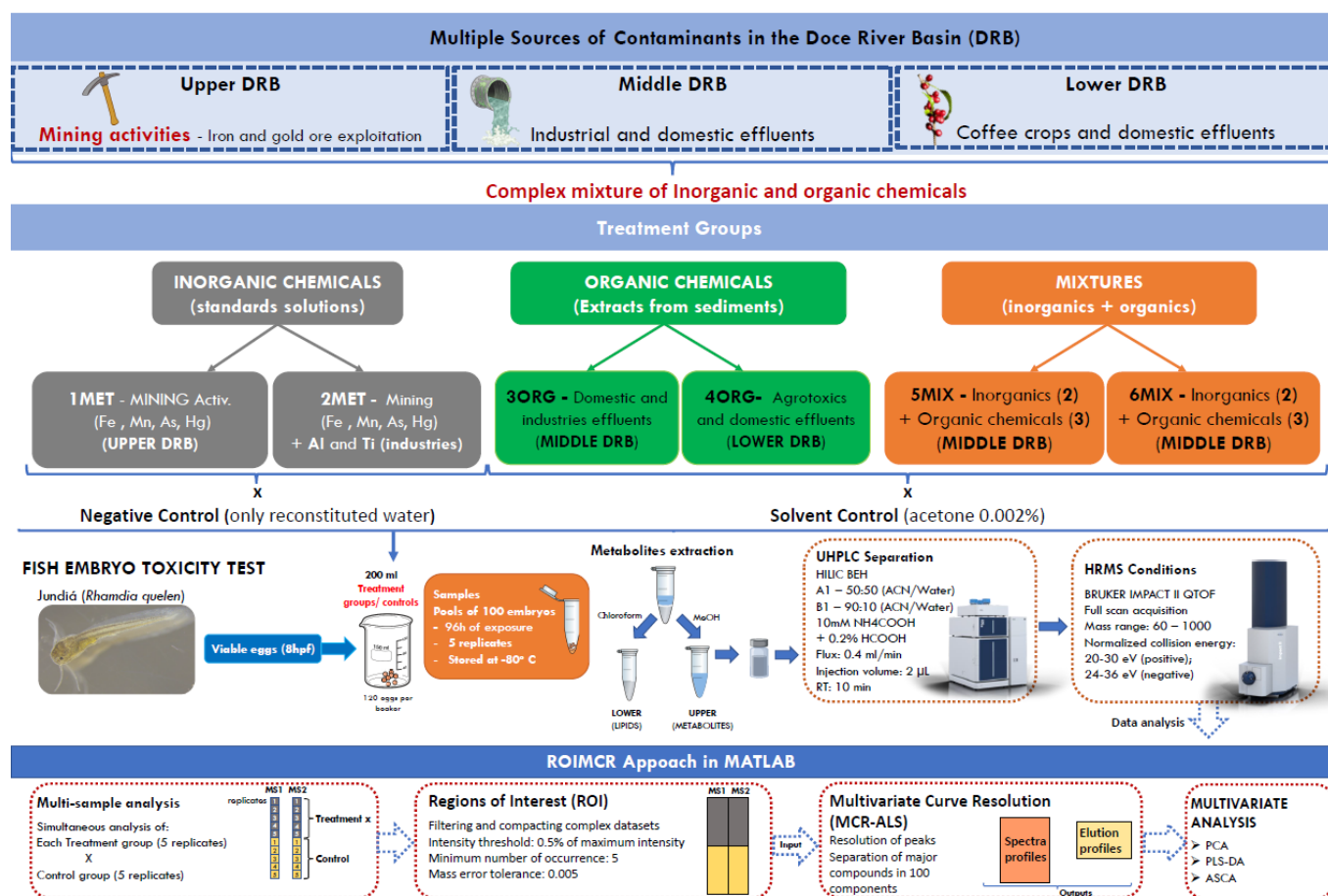
Paper 2 - Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental complex mixtures from Doce River in brazilian fish embryos

Abstract

Mining and other essential economic activities have a long historical impact on aquatic environments, such as the Doce River Basin (DRB), in Brazil. High concentrations of metals combined with organic chemicals introduced from multiple sources of contaminants may trigger complex toxicity pathways which are difficult to interpret and distinguish. For unveiling mechanisms of toxicity, LC-HRMS-based metabolomics combined with the ROIMCR approach for data analysis can be a powerful approach in field-scale monitoring studies, helping to properly comprehend the biological responses of environmental stressors. This study aimed to investigate mechanisms of toxicity of environmental chemicals from DRB using a comprehensive untargeted LC-HRMS metabolomics approach (data-independent acquisition of all ion-fragmentation mode), in fish embryos (*Rhamdia quelen*) exposed to chemical mixtures. To solve the problem of the complex mixtures generated by the large-scale datasets of mass spectra (MS/MS), the ROIMCR approach was applied to compress and resolute the data. Fish embryos exposed for 96h to 6 treatment groups showed a distinct pattern of responses when compared to controls, with downregulated essential metabolites, such as amino acids, as a main response, especially for metal exposure. Unexpectedly, the combination of organic contaminants extracted from sediments with inorganic elements showed reduced toxicity than isolated metal mixtures. The results helped to identify and distinguish the effects of different classes of environmental chemicals when combined as complex mixtures. HRMS combined with the ROIMCR approach represents a suitable strategy for metabolomics-derived data to identify and distinguish the effects of different classes of environmental chemicals and could be applied not only for the DRB assessment but also in other aquatic ecosystems.

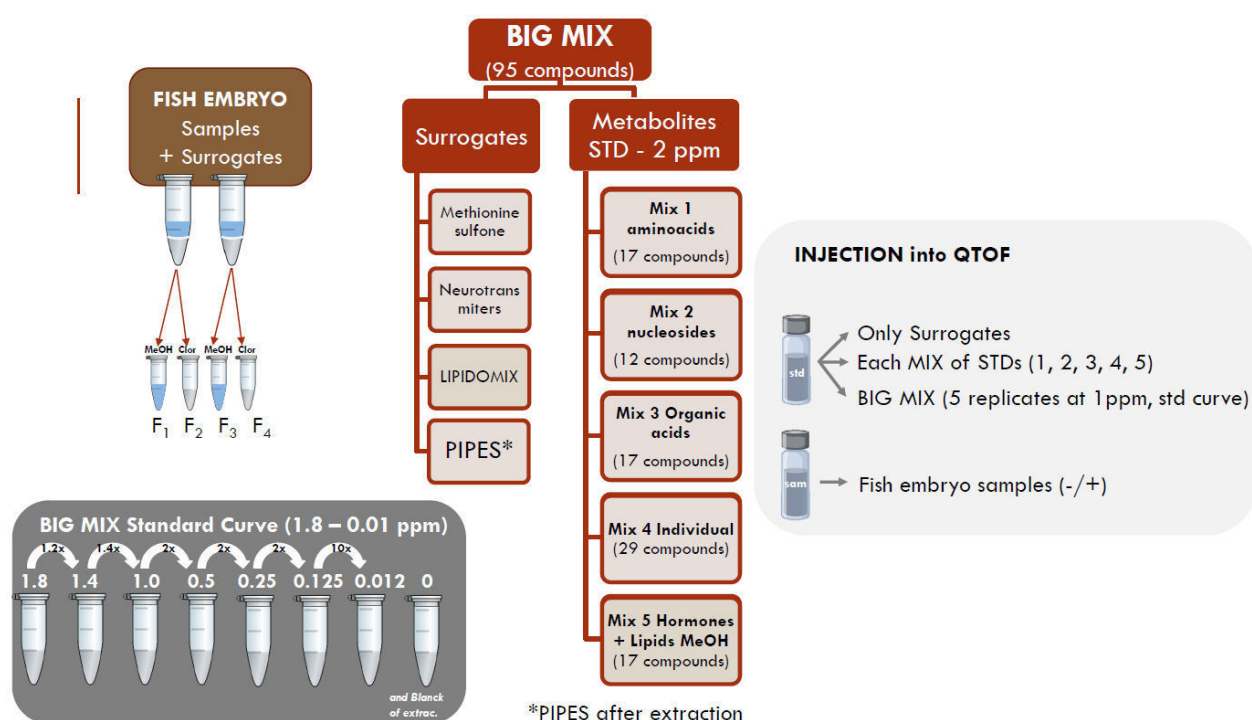
Keywords: Doce River, trace elements, organic contaminants, complex mixtures, essential metabolites, fish embryos

Figure 2. Workflow of the LC-HRMS-based metabolomics approach combined with ROIMCR for data analysis in the identification of main altered metabolites in fish embryo samples after exposure to different mixtures of inorganic and organic contaminants (isolated and combined). The mixtures of contaminants in the treatment groups were selected according to the sources of pollution present along the Doce River and considering relevant environmental concentrations of these chemicals. In addition to the Multivariate Curve Resolution method, other multivariate analyses were applied to observe the differences in the patterns of regulation of the metabolites under distinct conditions of chemical exposure.



Paper 3. *Simultaneous detection and identification of multiple metabolites standards as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics*

Figure 3. Different mixtures of metabolites were selected to be used as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics. Six different mixtures were prepared to contain metabolites of amino acids (1), nucleosides (2), organic acids (3), other polar metabolites (4), lipidic hormones and other hydrophobic metabolites (5), and a mixture of surrogates and internal standards. Additionally, a big mix mixture was performed containing a total of 95 compounds with the combination of all the 6 mixtures, diluted at different concentrations for obtaining a standard curve for their quantification in the targeted approach.



Simultaneous data analysis of LC-HRMS DIA in positive and negative modes using the ROIMCR approach for the identification of amino acids in untargeted metabolomics

Flávia Yoshie Yamamoto^{ab}, Carlos Pérez-López^a, Ana Lópes Antia^a, Silvia Lacorte^a, Denis Moledo de Souza Abessa^b, Romà Tauler^a

^a - Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Barcelona, Spain

^b - Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil.

Introduction

The increasing advance in OMICs techniques has rising comprehension of biological mechanisms as responses to multiple disturbing factors on the health of the organisms (Aslam et al., 2017; Debnath et al., 2010; Hasin et al., 2017). In this context, the global analysis of metabolites represents a powerful approach to unveiling new mechanisms of action in diverse research fields. (Bouhifd et al., 2013; Koelmel et al., 2020).

For measuring the levels of the metabolites in biological organisms/systems, High-resolution Mass spectrometry (HRMS) represents one of the main choices in analytical chemistry, considering its high sensitivity and specificity (Martín-Blázquez et al., 2019; Ortiz-Villanueva, Benavente, et al., 2017; Rochat et al., 2018). While a supervised approach allows the investigation of specific metabolites and potentially affected metabolic pathways, a non-supervised analysis assesses a broader range of small molecules, identifying a greater number of affected metabolites and consequently exploring new affected pathways (Salihovic et al., 2020).

In electrospray ionization (ESI) coupled with liquid chromatography, a high voltage introduced into the capillary may charge positively or negatively ions depending on the polarity of the applied voltage. The particular physiochemical property of each molecule may determine a proper ionization acquisition mode, with some presenting better ionization efficiency (IE) in the positive mode and others in the negative (Liigand et al., 2017). Therefore, the analysis of both acquisition modes is usually performed separately depending on the kind of molecules to be analyzed (Mak et al., 2019), which requires greater effort for the identification of different classes of metabolites. Other studies will choose only one of both to reduce this time-consuming effort, however also limiting the range assessment of potentially unknown metabolites.

The inherent large-sized complex datasets generated by the LC-HRMS approach, especially for data-independent acquisition (DIA) mode, consists of a great challenge for proper interpretation of data to understand the most relevant changes in an experimental condition. Different computer workflows have been proposed for extracting the significant signals features and their chemical

assignment in LC-HRMS datasets (Lynn et al., 2015; Tsugawa et al., 2015, 2020; Verhoeven et al., 2020; Xiao et al., 2012). The ROIMCR chemometrics approach is based on the bilinear model intrinsic data structure of the LC-MS data (Bayat et al., 2020; Gorrochategui et al., 2019; Jaumot et al., 2015; Ortiz-Villanueva, Benavente, et al., 2017) and represents an effective strategy for compressing and resolving data without losing relevant information and maintaining instrumental mass accuracy. To reduce the dimensionality of the data matrices, the “regions of interest” (ROI) approach considers some parameters, such as signal intensity threshold, mass error tolerance, and a minimum number of detected occurrences (Gorrochategui et al., 2019; Pérez-Cova et al., 2021). This initial “filtering” of the data selects the most relevant instrument signals (features) and eliminates possible interferences and background noise generated by the equipment and solvents used. Following data compression, the resolution of the elution and spectra profiles of the chemical constituents of the analyzed mixtures can be achieved with the Multivariate Resolution of Curve with Alternating Least Squares (MCR-ALS) method, as it has been extensively reported by (de Juan et al., 2014; Marçó et al., 2014; Tauler, 2021; Tauler et al., 2015).

Within the unsupervised metabolomics approach, our research group has recently shown for the first time the possible simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA raw data by the ROIMCR approach for the identification of per-polyfluoroalkyl substances (Pérez-López et al. 2023). This new approach allows an improved linking of MS1 and MS2 (MS/MS) DIA spectra of the resolved components by ROIMCR, i.e. linking the MS1 signals of the precursor ions with the MS2 signals of their fragments for every chemical compound of the analyzed sample. In this sense, a step forward in this approach is the simultaneous analysis of data-independent acquisition in positive and negative modes, which has not yet been exploited. Therefore, in this work we propose the simultaneous analysis of MS1 and MS2 DIA for both positive and negative modes, to increase the coverage of possible metabolites identified as well as to improve the efficiency of the data analysis procedures in unsupervised metabolomics studies.

Material and Methods

First, one synthetic mixture of amino acids from analytical standards was prepared and analyzed to confirm their detection by the applied LC-HRMS method. In addition, the metabolites of seven fish embryo samples were also analyzed for the detection and identification of the amino acids. For both situations, it was verified the possible simultaneous analysis of datasets of MS1 and MS2 DIA for positive and negative modes, using the proposed ROIMCR approach.

Amino acid analytical standards

The amino acid standard solution containing 17 amino acids and ammonium chloride was purchased from Sigma Aldrich® (AAS18). The concentrated solution of 2.5 $\mu\text{M ml}^{-1}$ (except by L-Cystine at 1.25 $\mu\text{M ml}^{-1}$) was diluted (5 x with 50:50 ACN/water) to reach a concentration of approximately 2 ppm (detailed information available in the Supplementary Material). In addition, two different internal standards were spiked at 1 ppm, the Methionine Sulfone (Sigma Aldrich®) and the 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid (PIPES).

Metabolites extraction in fish embryo samples

For the analysis of amino acids in biological samples, fish embryos (*Rhamdia quelen*) were obtained in the Panama Fish Farm (Paulo Lopes, Brazil) in March 2021 according to Yamamoto et al., (2022). The viable fish embryos (approximately 120 per beaker, 5 replicates) were maintained in 200 ml of reconstituted water (CaCl₂ 294.0 mg L⁻¹, MgSO₄ 123.3 mg L⁻¹, KCl 5.7 mg L⁻¹, and NaHCO₃ 64.7 mg L⁻¹) for 96 hours, with the exchange of half of the solution every 24h according to OECD 203 guidelines (1992). The surviving individuals (>82%) were frozen at -80°C until the analysis and were transported to the Institute of Environmental Assessment and Water Research (Barcelona, Spain) under dry ice (<-20° C).

Amino acids and other metabolites were extracted from 7 pooled samples (approximately 50 mg of lyophilized embryos for each sample) according to the method proposed by (Ortiz-Villanueva et al., 2018a). For the extraction, the samples were previously homogenized with 900 μL of ice-cold methanol (Fisher) by vortexing for 15 s and in the Tissue lyzer LT (Qiagen) for 4 min (40Hz). To optimize the separation of metabolites, 500 μL of water and 400 μL of chloroform were added to form an additional hydrophobic phase to separate metabolites (upper phase) from unwanted lipids (lower phase). The aqueous fraction containing the metabolites, including amino acids, was evaporated under nitrogen gas flow and reconstituted in 450 μL of 1:1 acetonitrile: water (v/v).

Liquid Chromatography/High-resolution Mass spectrometry (LC-HRMS)

The liquid chromatographic separation of the amino acids (standard solution and fish embryo extracted samples) was performed using an Acquity UPLC BEH HILIC Column (2.1 x 50 mm, 1.7 μm) from Waters™ on a UHPLC system (Bruker). The protocol followed instructions proposed by the producer (WATERS, 2009) with few modifications (**Table S1 in Supplementary Material**). Separations of 10 min started with a gradient of elution of 99.9% of B1 mobile phase (90:10 Acetonitrile/Water, 10 mM ammonium formate + 0.2% formic acid) increasing to 75% in 4 min and 50% in 6 min. Concentrations of A1 (50:50 Acetonitrile/Water, 10 mM ammonium

formate + 0.2% formic acid) reached 90% in 7 min and returned to 0.1% after 8 min. Conditions of full scan mass ranging from 60 to 1000 m/z acquired with a High-Resolution Mass Spectrometry QTOF (Bruker Impact II) are presented in the **Supplementary Material TableS2**. The ionization source operated in positive (20-30 eV switching normalized collision energy, 4 eV of ion energy) and negative mode (24-36 eV switching normalized collision energy, 6 eV of ion energy) separately in different chromatographic runs, alternating MS scans of the precursor ions and all ion fragmentation (AIF). All solvents were analytical grade or higher purity.

Data Analysis

LC-MS data obtained in the analysis of the amino acids standards and fish embryo samples were independently processed by the ROIMCR chemometric method (de Juan et al., 2014; Gorrochategui et al., 2016, 2019; Tauler et al., 2015), which consists of a first step (Regions of interest, ROI) to reduce the dimensionality of the data followed by the application of the multivariate curve resolution (MCR) method (Pérez-Cova et al., 2021) to resolve the elution and mass spectra profiles of the chemical constituents of the analyzed samples. In this work, MS1 and tandem MS/MS (or MS2) data acquired independently (DIA) were simultaneously analyzed either separately in positive (+) and negative (-) ionization modes (or simultaneously, in MS1(+), MS1(-), MS2(+) and MS2(-) modes. The procedure has the following steps (Figure 1).

Figure 1 near here

1) Import of data

Firstly, the raw data obtained through the Bruker LC-HRMS were converted to a NetCDF data file (or mzXML files) through the Compass DataAnalysis software 5.2 (Bruker, Germany) and imported into MATLAB R2020a computing and visualization environment. This could be performed either using the MSroi app as described by Pérez-Cova et al., (2021) in MATLAB or via mass spectrometry functions of the Bioinformatics toolbox (The Mathworks, Inc., 2020b).

The data from the amino acids standard samples were imported using the MSroi GUI app as a single chromatographic run (single sample option) while the data from the 7 replicate fish embryo samples were imported as multiple chromatographic runs (using the multi-sample option) arranged as a column-wise augmented data matrix (see Figure 1).

2) Regions of interest (ROI)

Before applying the ROI compression procedure to the NetCDF imported datasets, the MS1 and MS2 scans in positive (+) and negative (-) modes were separated, either for the analysis of the single sample (amino acids standards) or for the simultaneous analysis of the multiple fish embryo samples. After performing this data separation, ROI compression was performed separately for MS1(+), MS1(-), MS2(+), and MS2(-) datasets. Additionally, small parts of the chromatograms were cut by selecting only the time intervals of interest, disregarding the beginning (void chromatographic column) or the end (cleaning the column) of the chromatographic run.

For selecting the most relevant MS instrumental signals, thereby reducing the dimensionality of the imported datasets, the ROI approach was carried out according to Gorrochategui et al. (2019) and Pérez-Cova et al., (2021). The implementation of the ROI procedure filters the signals of the datasets (avoiding background noise and selects those more relevant according to a set of three parameters 1) an MS signal intensity threshold to disregard instrumental noise; 2) a mass deviation related to the mass resolution of the used mass spectrometer to distinguish among different m/z values; 3) a minimum number of MS signals that define a chromatographic peak depending on the LC system used and on the MS detector speed.

A lower signal intensity threshold may consider more m/z values of compounds at lower concentrations or with poorer ionization efficiencies. On the other hand, a too-low intensity threshold could include a significant amount of experimental noise in the final results. The ROI analysis generates a data matrix with a number of rows equal to the number of elution times and a number of columns equal to the number of MSROIs. This data matrix has the filtered MSROI data (following the parameters previously mentioned for each MS1 and MS2 dataset). The data matrices resulting from the ROI compression can be augmented row-wisely (horizontal concatenation) and be analyzed simultaneously in the two acquisition modes, the MS1 and the MS2 DIA data, at the same chromatographic retention times. This row-wise data matrix augmentation can be extended to include MS1 and MS2 DIA modes in both positive and negative ionization. An additional step for filtering those MSROIs with good elution profiles (through graphical visualization) was performed to improve the analysis before performing the MCR-ALS, excluding those features with poor resolution, usually related to noise, also present in blank samples.

It is important to highlight that the row-wise matrix augmentation to analyze MS1, and MS2 DIA in positive and negative ionization modes, require that they are aligned to the same retention times. In other words, even if the acquisitions were performed in different chromatographic runs (as it occurred in the current study), the retention times between these datasets should be aligned as

much as possible before the horizontal concatenation of the corresponding individual data matrices in the different acquisition modes.

3) *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares (MCR-ALS)*

$$\mathbf{D}_{\text{MS}} = \mathbf{C} \mathbf{S}_{\text{MS}}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equation 1}$$

Previously arranged MSROI data matrices, $\mathbf{D}_{\text{MS}}$, were decomposed using Multivariate Curve Resolution into the product of two-factor matrices with the elution profiles, $\mathbf{C}$, giving the relative concentrations of the compounds, and the MS spectra profiles, $\mathbf{S}^T$, giving the spectra with the MS signals and their m/z values, for the N selected components. Not explained variance is stored in the residuals/error data matrix, $\mathbf{E}$, (Equation 1).

The mass spectra of every resolved component (potentially representing a chemical compound) have the MS1 and MS2 signals of the precursor and fragment ions, respectively, for each acquisition and ionization mode.

MCR can be performed separately for each chromatographic run using one acquisition and ionization mode or simultaneously using multiple chromatographic runs and acquisition, as described by Pérez-Lopez et al. (2023), and ionization positive and negative modes, as shown in the following Equations 2-5.

$$\mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}} = \mathbf{C} \mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T + \mathbf{E}_{\text{MS1,MS2}} \quad \text{Equation 2}$$

When multiple chromatographic runs are analyzed simultaneously, the different individual data matrices, $\mathbf{D}_{\text{MS}}$, are concatenated vertically sharing the same spectral vector space, as shown in Equation 3 for the case of concatenating chromatographic multi-run data matrices acquired in two acquisition modes, either in positive or negative ionization.

$$\mathbf{D}_{\text{MS1,MS2,aug}} = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}} \\ \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2}} \\ \dots \\ \mathbf{D}_{\text{MS1,MS2,K}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \mathbf{C}_2 \\ \dots \\ \mathbf{C}_K \end{bmatrix} \mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1 \\ \mathbf{E}_2 \\ \dots \\ \mathbf{E}_K \end{bmatrix} = \mathbf{C}_{\text{caug}} \mathbf{S}_{\text{MS1,MS2}}^T + \mathbf{E}_{\text{MS1,MS2,aug}}$$

$$\text{Equation 3}$$

Where now $\mathbf{D}_{\text{MS1,MS2,aug}}$, $\mathbf{C}_{\text{aug}}$ and $\mathbf{E}_{\text{MS1,MS2,aug}}$ refer to the augmented vertically concatenated, concentration (elution profiles) and residual/error matrices, when multiple MSROI data matrices coming from different chromatographic runs are simultaneously analyzed.

This vertical concatenation can be also extended (introduced for the first time in this work) when two ionizations modes are simultaneously analyzed as shown in the following Equations 4 and 5

$$\mathbf{D}_{\text{MS1+,MS1- MS2-,MS2-}} = \mathbf{C} \mathbf{S}_{\text{MS1+,MS1-, MS2-,MS2-}}^T + \mathbf{E}_{\text{MS1+,MS2+,MS1-,MS2-}} \quad \text{Equation 4}$$

$$\mathbf{D}_{\text{MS1+,MS1+ MS2-,MS2-,aug}} = \mathbf{C}_{\text{aug}} \mathbf{S}_{\text{MS1+,MS1-, MS2-,MS2-}}^T + \mathbf{E}_{\text{MS1+,MS2+,MS1-,MS2-,aug}} \quad \text{Equation 5}$$

In all these Equations, the $\mathbf{C}$ and $\mathbf{C}_{\text{aug}}$ concentration matrices, have the elution profiles of every component resolved by MCR-ALS in one of or in multiple chromatographic runs. From the peak areas or heights of the elution profiles resolved in $\mathbf{C}$ or $\mathbf{C}_{\text{aug}}$, quantitative information on every resolved component can be obtained. This is especially useful in the case of multiple samples (chromatographic runs) simultaneously analyzed (in $\mathbf{C}_{\text{aug}}$), for calibration purposes or semiquantitative estimations, in case of the absence of standards in the analyzed samples. With this information, the variation of the concentrations of the metabolites among different samples can be studied.

On the other hand from the ion signals in the resolved mass spectra, $\mathbf{S}_{\text{T}} (\text{MS1, MS2, MS(+)}, \text{MS(-)})$ or horizontally concatenated), also the compound annotation or identification step can be performed and improved in case of having the spectra obtained in different acquisition modes.

Figure 1 near here

The complete data analysis workflow is summarized in Figure 1. And the different type of data matrices concatenations and augmentations are displayed in Figures 2 (augmentation of multiple acquisition and ionization modes) and 3 (augmentation of multiple chromatographic runs at different acquisition and ionization modes)

Figures 2 and 3

These different types of data fusion are proposed for the first time in this work.

The application of the MCR-ALS to all these MSROI data matrices followed the same steps:

i) Initial estimation of the number of components (N) to be resolved. This includes chemical components as well as possible other signal contributions from the solvents, chromatographic column, or spectrometer signals, including baseline and background. These different contributions are usually easily discerned from the features of their concentration and spectral profiles in **C** and **S^T** factor matrices. Initially, the number of components proposed can be selected visually from the plot of sizes of the singular values (or eigenvalues) of the data. MCR-ALS can be then tested with a different number of components and select the model which better explains the data without overfitting nor including extra noisy components without chemical meaning.

ii) Initial estimation of one of the two-factor matrices, either **C** or **S^T**. This can be performed by selecting the N more different MS spectra at the different retention times (in the rows of the data matrix **D_{MS}**) or the more different chromatograms at the different ROI m/z values (in the columns of the data matrix **D_{MS}**). A simple way to perform this operation is with the well-known purest variable selection used in the SIMPLISMA method (Bogomolov & Hachey, 2007; Nardecchia & Duponchel, 2020).

iii) MCR-ALS optimizes **C** and **S^T** factor matrices using an alternating least squares optimization, in two successive steps expressed in the two minimization Equations 6 and 7

$$\min_{\hat{\mathbf{C}}, \text{const}} \|\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}} - \hat{\mathbf{C}} \hat{\mathbf{S}}^T\| \quad \text{Equation 6}$$

$$\min_{\hat{\mathbf{S}}^T, \text{const}} \|\hat{\mathbf{D}}_{\text{PCA}} - \hat{\mathbf{C}} \hat{\mathbf{S}}^T\| \quad \text{Equation 7}$$

Where **D_{PCA}** refers to the ROIMS data matrix reproduced for the number of components selected in step and **$\hat{\mathbf{C}}$** and **$\hat{\mathbf{S}}^T$** are the current estimations of **C** and **S^T**. During the optimization, a set of constraints are applied, which in the case of the LC-HRMS data investigated in this work were only the non-negativity of the elution and mass spectra profiles in **C** and **S^T** factor matrices, and the normalization of the mass spectra profiles in **S^T** to have maximum intensity values of one. This ALS optimization ends when convergence is achieved or setting a limiting number of iterations. The quality of the results can be evaluated by the amount of experimental variance (**R₂**, Equation 8) and in case of validation and compound identification, the recovery of the correct profiles can be estimated by the similarity between the theoretical mass spectra profiles and their estimations by the ROIMCR method, using, for instance, their pair-wise correlation coefficient, **r²**, or the angle between the two spectral vectors in Equations 9 and 10

$$R^2 = 100 \times \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n d_{ij}^2}\right) \quad \text{Equation 8}$$

$$r^2 = \frac{\mathbf{xy}^T}{\|\mathbf{x}\| \|\mathbf{y}\|} \quad \text{Equation 9}$$

$$angle = 180 \frac{180}{\pi} \times \arccos\left(\frac{\mathbf{xy}^T}{\|\mathbf{x}\| \|\mathbf{y}\|}\right) \quad \text{Equation 10}$$

Computer programs and software for the ROIMCR and MCR-ALS methods are freely available as a graphical-user-friendly interface (GUI) in the MATLAB® environment (Jaumot et al., 2015)

4) *Identification of the amino acids*

The identification of the amino acids from the mass spectra profiles resolved by the MCR-ALS, both in the standard solution and in the fish embryo samples, was initially performed by checking their m/z ROI values for precursor (MS1) and fragment (MS2) ions available in databases (Mass Bank, PubChem (Horai et al., 2010). To confirm the amino acid identity, it was considered a minimum mass error of 0.01 both for MS1 and MS2 values. Mass measurement accuracy (average of individual mass errors) of 0.0017 Da was obtained for the positive acquisition mode and 0.0034 Da for the negative acquisition mode.

In addition, the identity of the amino acids verified by the ROIMCR approach was further confirmed using the Data Analysis from Bruker's MS software, and also the MS-DIAL software (Tsugawa et al., 2015) by checking the reference matched (MS1 and MS2 confirmed with literature databases, total score >850 in compound search information) and suggested ions (only MS1 is confirmed). To do this, the raw MS data NetCDF files were converted to ABF format and the parameters were set with similar conditions to those used for the ROI analysis, with few modifications (intensity threshold of 1,000, mass error of 0.01, other details in the Table S4 in the Supplementary material) to increase the sensitivity of the analysis and consider more potential compounds, with milder filtering conditions.

Results and Discussion

1) ROI results and parameter selection

Significant reduction of the data dimensionality of the amino acids standard sample was achieved by selecting the following ROI parameters (Table 1): a signal intensity threshold of 5,000 (the equivalent of 0.1% of maximum intensity), a factor signal of 1, a mass error tolerance of 0.005 and minimum occurrence of 5 scans. Similar parameters were used for the ROI analysis of fish embryo samples, except for the intensity threshold which was set to a higher value of 10,000 (0.5%) due to the increased size of the data for biological samples.

For instance, the original raw data file (.cdf) of 398.61 KB in the positive mode and 114.28 KB for the negative mode were compressed to 213 KB (600 x 1262 ROIs) and 153 KB (600 x 1168 ROIs), respectively, after ROI analysis of MS1 and MS2 augmented tables. Similarly, the 7 fish embryo samples of an average of 442,612 KB each (all together occupying 3.098 GB) in the positive mode and 113,922 KB (together 797,458) in the negative mode, were reduced to 297 KB and 153 KB, respectively.

Table 1 near here

For the analysis of the amino acids' standards, it was selected 30 components (Table 2), while the fish embryo samples had 100 components considering the elevated variety of features present in biological samples. Non-negativity constraints of the elution and mass spectra were also selected for avoiding ambiguity of results. All MCR-ALS analyses provided more than 99.5% of explained variance and fitting error (not explained data) lower than 6.3% for both the amino acids standard and the fish embryo samples.

Table 2 near here

Figure 4 near here

ROIMCR analysis allowed identifying all seventeen amino acids present in the standard mixture sample (see Table 3 and Figure 4), as well as the two internal standards present in the sample. Figure 4 shows the different elution profiles and mass spectra obtained for the four acquisition modes (MS1(+)/MS2(+)/MS1(-)/MS2(-)). As expected, it is possible to observe in the mass spectra, higher m/z values for MS1 when compared to MS2 for both acquisition modes.

The LC-HRMS method with the HILIC column used in this study represented a fast, simple, and effective strategy for separating and detecting the amino acids (Figure 4), as was also reported by

Violi et al. (2020) . In addition, the ROIMCR approach can help solve the mixture problem even in situations of compounds' coelutions by significantly improving the resolution of peak shapes.

Table 3 near here

Different signal intensities were obtained for the acquisitions in positive and negative modes for the different amino acids. When MS1 and MS2 DIA data in positive and negative ionization modes were analyzed separately (Equation 2), distinct sets of fifteen amino acids were detected, with the L-proline and L-valine being detected only in the positive mode and the L-glycine and L-Cystine only in the negative mode. In general, better ionization efficiency (higher intensity values) was obtained for the amino acids detected at the positive mode (average of 928117.6, 10 amino acids with the highest intensities, Table 3), than the negative mode (average of 395,887.7). This is also illustrated by Figure 4 since higher peaks are observed for the positive mode in the elution profiles graphs. On the other hand, both internal standards showed higher intensities for the negative mode. According to the literature, the ionization of amino acids is mostly operated in the positive mode due to its higher ionization efficiency (Liu et al., 2019; Mak et al., 2019; Violi et al., 2020). But alternatively, it can also be performed in negative acquisition since not all amino acids give significant signals in the positive mode (Piraud et al., 2003). The amino acids' inherent amphoteric property allows functional groups to either receive or donate protons, therefore having a zwitterionic form. However, their different physiochemical properties may determine different ionization efficiencies (Violi et al., 2020). Contrary to general practices, Liigand et al., (2017) reported that a better IE in the negative mode was obtained for 33 compounds that ionize in both modes, including amino acids, when compared to the positive mode.

When MS1 MS2 DIA data in both positive and negative ionization modes were simultaneously analyzed (Equation 4) by the ROIMCR, most of all (except cysteine) amino acids present in the amino acids standard mixture were properly detected and resolved.

Figure 5 near here

Figure 5 gives the elution and spectra profiles of two different amino acids (L-phenylalanine and L-arginine) detected in M1 MS2 DIA in both positive and negative modes (Total Ion chromatograms are shown in Figure S1 in the Supplementary Material). Apart from their molecular formulas, MS1 and MS2 major ions in positive and negative modes obtained from their respective ROIMCR resolved spectra are given, as well as their ROIMCR elution profiles with the

number of scans or retention times in the x-axis, and the ROIMCR MS spectra in the four modes, MS1+, MS2+, MS1- and MS2-. As expected, the elution profile (left side) shows the earlier elution time of L-phenylalanine (169.3 sec) when compared with L-arginine (368.6 sec). This is explained by the lower polarity of the former when compared to the latter. For both amino acids, it was observed higher ionization efficiency in the positive acquisition mode as reflected in the different scales in the y-axis in the spectra profile. In the four cases, their values were scaled to their maximum value equal to one, which was achieved for MS1 in positive mode for both L-Phenylalanine and L-Arginine. The latter however did not give a significant MS2+ signal. The identity of the amino acid can be potentially examined with the correspondent link of main precursor ions in positive (protonated ion $[H^+]$) and negative (deprotonated ion $[H^-]$) modes differing approximately an m/z of 2.01.

The most outstanding result by means of the proposed ROIMCR methodology is that it allows the direct linking and correspondence between the MS signals in the four acquisition modes (MS1(+)/MS2(+)/MS1(-)/MS2(-)), for the same chemical species; with the m/z values detected in the positive and negative modes for each amino acid, for both MS1 and MS2 mass spectra (see Table 3 and 4). In other words, similar spectra profiles observed for the separated analysis of positive and negative modes were verified when they were simultaneously analyzed. This indicated the advantages and possibilities of performing the proposed simultaneous analysis of the different acquisition and ionization modes in the MS analysis of the same sample. Linking the spectra of the different amino acids in their four acquisition modes facilitates considerably their coverage, identification, and possible quantitation (Pérez-López et al. (2023)

3) ROIMCR results in the analysis of the fish embryo samples

After confirming the detection of the amino acids in their standard mixture sample, their presence in the fish embryo samples was investigated using the ROIMCR approach.

Similarly, to the pattern observed for the amino acids' standard, it was possible to observe a better ionization efficiency for the positive mode, with more ROIs of higher intensity being obtained for this acquisition mode when compared to the negative (Table 2, Figure 6). Figure 6 shows the relative similarity of the elution profiles of all seven replicates for each acquisition mode. It also illustrates the higher m/z values of the MS1 ions in the mass spectra in comparison to MS2 ion fragments. Contrary to the amino acids' standard, the high number of metabolites in the fish embryo samples does not allow to identify the amino acid peaks in the elution profile graph obtained after MCR analysis.

Figure 7 near here

In Figure 7, ROIMCR results are shown for the resolution of L-Threonine (up) and L-Valine (down) amino acids in the analysis of the seven different embryo samples analyzed. As in Figure 5, m/z values of the major MS signals for the two amino acids are given for the different acquisition and ionization modes, which are in agreement with those expected for these two amino acids (see Table 2). Whereas L-Threonine gave significant signals at the four acquisition and ionization modes, L-Valine was giving MS signal only in positive ionization, for both MS1 and MS2 DIA acquisition modes.

In the upper subplot for L-Threonine and the lower subplot for L-Valine, the seven elution profiles obtained by ROIMCR in the resolution of the seven embryo samples (seven replicated sample extractions) are shown giving good peak shapes. The reproducibility of these peaks indicates the adequacy of the analytical procedure and the correct ROIMCR resolution of these two amino acids in the different samples analyzed with only some small differences in the height and peak areas (also in the two subplots below). In the overlaid elution profiles plot also given in the two subplots, proper alignment, and peak shapes among the elution profiles of both amino acids in the ROIMCR analysis of different embryo sample replicates was achieved. This means that the different chromatographic runs of the 7 samples showed similar elution profiles for the amino acids and that the MCR-ALS was capable to integrate them improving the peak's resolution. Finally, on the right side of the two subplots, the spectra profiles of the amino acid show the different MS1 and MS2 DIA signals for the two ionization modes. Whereas for L-Threonine MS1 and MS2DIA signals were recorded in the four acquisition and ionization modes, note that no MS signal nor m/z value is shown for Valine in the negative mode due to its poorer ionization using the LC-HRMS parameters of this study.

In traditional analytical work, a broad assessment of multiple classes of compounds requires usually two separate runs in positive and negative modes, or the optimization of chromatographic conditions to carry out a single run on each of these two acquisition modes (Bang et al., 2012; Piraud et al., 2003). This is time-consuming. Even when both ionization modes are measured simultaneously (switching-acquisition), the data analysis either is usually performed separately or as a target analysis for some specific ions, m/z values (Dey et al., 2020; Yang et al., 2014). In contrast, the possible combination of MS1 and MS2 DIA in positive and negative datasets, as demonstrated in this work, can increase the number of simultaneously detected compounds with broader chemical coverage and diversity, optimizing efforts in data analysis in a shorter time.

Moreover, the identification steps are extremely facilitated with the direct links established between precursor ions (in MS1) and fragment ions (in MS2 DIA) and with different signals in the two ionization modes. The suitability of the ROIMCR concept associated with the bilinear factor decomposition of both MS1 and MS2 arranged in a single matrix has been recently shown by Pérez-López et al. (2023). As also performed in the current study, the different signal patterns obtained from MS1 and MS2 can be combined in one single chromatogram that facilitates the identification and quantification of the analytes in the samples.

We have done the comparison of ROIMCR results with those obtained using the MS-DIAL software (Lai et al., 2017; Tada et al., 2019; Tsugawa et al., 2015), which confirmed the identity of the seventeen amino acids and the two internal standards, with their corresponding m/z values in MS1 and MS2 DIA and with matched retention times. Since MS-DIAL does not allow performing the simultaneous analysis of the positive and negative ionization modes, it was necessary to perform the ion search separately. For the positive mode, MS-DIAL identified the presence of thirteen amino acids detected in the fish embryo samples (reference matched, total score >850) and two suggested ions (L-threonine and L-aspartate). On the negative mode, fewer amino acids were identified as reference-matched ions. MS-DIAL could only detect five amino acids with a good reference matched, and eight as suggested ions by the MS-DIAL. For both positive and negative modes, methionine sulfone was found as a reference-matched metabolite and PIPES as the suggested ion. Although it is a suitable software that greatly facilitates compound searching, it is necessary to look for both acquisition modes, considering reference matched and suggested ions conditions, to amplify the coverage of the identified metabolites.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study showed for the first time the suitability of the simultaneous data analysis of MS1+,MS2+,MS1-,MS2- using the ROIMCR approach for the identification of amino acids in a standard mixture solution and biological samples. Similar results were obtained with the simultaneous data analysis when compared to the individual analysis of the positive and negative acquisition modes, which can optimize time efforts for the identification of the metabolites and also improve their coverage. The link established between the MS1+,MS2+,MS1-,MS2- acquisitions for the same chemical compound greatly facilitated their identification.

The identification of the amino acids in the fish embryo samples by the ROIMCR confirmed the reliability of performing this strategy for non-supervised (non-targeted) metabolomics

approaches. This is important with the rapid growth of unsupervised type of analysis using data-independent acquisition modes which allows one to obtain more information from a sample than using supervised type of analysis.

This study encourages further metabolomic investigations using the ROIMCR-described approach combining different MS acquisition modes. This strategy may be suitable for non-supervised (untargeted) analysis and initial screening of main concentration changes of metabolites under an experimental condition, and also for an initial comparison of ionization efficiencies of different compounds before optimizing a protocol. Therefore, the simultaneous analysis proposed herein may be useful for reducing time analysis and improving analysis productivity, and maintaining the reliability of results.

References

- Altenburger, R., Walter, H., & Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environmental Science and Technology*, 38(23), 6353–6362. <https://doi.org/10.1021/es049528k>
- ANA, A. N. de águas. (2015). *Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG*.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- ATSDR, A. for T. S. and D. R. (2018). *Framework for Assessing Health Impacts of Multiple Chemicals and Other Stressors*. <https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ipga.html>
- Backhaus, T., & Blanck, H. (2010). *Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art, Gaps and Options for Improvement*. Malin Carlgren.
- Bang, D. Y., Lim, S., & Moon, M. H. (2012). Effect of ionization modifiers on the simultaneous analysis of all classes of phospholipids by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion mode. *Journal of Chromatography. A*, 1240, 69–76. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.03.073>
- Bayat, M., Marín-García, M., Ghasemi, J. B., & Tauler, R. (2020). Application of the area correlation constraint in the MCR-ALS quantitative analysis of complex mixture samples. *Analytica Chimica Acta*, 1113, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.057>
- Boelsterli, U. A. (2007). *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets* (U. A. Boelsterli, Ed.; Second Edi). Taylor & Francis Inc, CRC Press.
- Bogomolov, A., & Hachey, M. (2007). Application of SIMPLISMA purity function for variable selection in multivariate regression analysis: A case study of protein secondary structure determination from infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 88(1), 132–142. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2006.07.006>
- Borba, R. P., Figueiredo, B. R., & Matschullat, J. (2003). Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. *Environmental Geology*, 44, 39–52. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0766-5>

- Bouhifd, M., Hartung, T., Hogberg, H. T., Kleensang, A., & Zhao, L. (2013). Review: Toxicometabolomics. In *Journal of Applied Toxicology* (Vol. 33, Issue 12, pp. 1365–1383). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/jat.2874>
- Castro, C., & Griffin, J. (2020). Lipids and NMR: more than mere acquaintances. *Nuclear Receptor Research*.
- Clish, C. B. (2015). Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies*, 1(1), a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>
- CPRM, S. G. do B. (2015). *Monitoramento Especial da bacia do Rio Doce: Relatório 02 Geoquímica*.
- de Juan, A., Jaumot, J., & Tauler, R. (2014). Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Analytical Methods*, 6(14), 4964–4976. <https://doi.org/10.1039/c4ay00571f>
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2010). Omics Technology. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, 11–31. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_2
- Dettmer, K., & Hammock, B. D. (2004). Metabolomics - A new exciting field within the “omics” sciences. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 112, Issue 7). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1289/ehp.112-1241997>
- Dey, A. S., Ayon, N. J., Bhattacharya, C., Gutheil, W. G., & Mukherji, M. (2020). Positive/negative ion-switching-based LC–MS/MS method for quantification of cytosine derivatives produced by the TET-family 5-methylcytosine dioxygenases. *Biology Methods and Protocols*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/BIOMETHODS/BPAA019>
- Dias, C. A., Costa, A. S. V. da, Guedes, G. R., Umbelino, G. J. de M., Sousa, L. G. de, Alves, J. H., & Silva, T. G. M. (2018). Impactos do rompimento da barragem de Mariana na qualidade da água do rio Doce. *Revista Espinhaço | UFVJM*, 7(1), 21–35.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic Metals inducing oxidative stress.pdf. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 529–539.
- Escher, B. I., Stapleton, H. M., & Schymanski, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367(6476), 388–392. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAY6636>
- Fernandes, G. W., Goulart, F. F., Ranieri, B. D., Coelho, M. S., Dales, K., Boesche, N., Bustamante, M., Carvalho, F. A., Carvalho, D. C., Dirzo, R., Fernandes, S., Galetti, P. M., Millan, V. E. G., Mielke, C., Ramirez, J. L., Neves, A., Rogass, C., Ribeiro, S. P., Scariot, A., & Soares-Filho, B. (2016). Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza e Conservacao*, 14(2), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2016.10.003>
- Gauthier, P. T., Norwood, W. P., Prepas, E. E., & Pyle, G. G. (2014). Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic Toxicology*, 154, 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.026>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., & Tauler, R. (2019). ROIMCR: A powerful analysis strategy for LC-MS metabolomic datasets. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-2848-8/FIGURES/6>
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusis, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* 2017 18:1, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1215-1>

- Hatje, V., Pedreira, R. M. A., De Rezende, C. E., Schettini, C. A. F., De Souza, G. C., Marin, D. C., & Hackspacher, P. C. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>
- Hillyer, K. E., Raes, E., Karsh, K., Holmes, B., Bissett, A., & Beale, D. J. (2022). Metabolomics as a tool for in situ study of chronic metal exposure in estuarine invertebrates. *Environmental Pollution*, 292, 118408. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118408>
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M. Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., ... Nishioka, T. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 45(7), 703–714. <https://doi.org/10.1002/JMS.1777>
- IBAMA, I. B. do M. A. e dos R. N. R. (2015). *Laudo Técnico Preliminar - Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais*.
- Jacobsen, P. R., Axelstad, M., Boberg, J., Isling, L. K., Christiansen, S., Mandrup, K. R., Berthelsen, L. O., Vinggaard, A. M., & Hass, U. (2012). Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 237–250. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.099>
- Jarvis, I. W. H., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., & Stenius, U. (2014). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*, 321, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.012>
- Jaumot, J., de Juan, A., & Tauler, R. (2015). MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 140, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011a). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011b). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Koelmel, J. P., Napolitano, M. P., Ulmer, C. Z., Vasiliou, V., Garrett, T. J., Yost, R. A., Prasad, M. N. V., Godri Pollitt, K. J., & Bowden, J. A. (2020a). Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. *Metabolomics*, 16(5), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01665-3>
- Koelmel, J. P., Napolitano, M. P., Ulmer, C. Z., Vasiliou, V., Garrett, T. J., Yost, R. A., Prasad, M. N. V., Godri Pollitt, K. J., & Bowden, J. A. (2020b). Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. In *Metabolomics* (Vol. 16, Issue 5, pp. 1–22). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01665-3>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Ogiwara, A., Meissen, J., Showalter, M., Takeuchi, K., Kind, T., Beal, P., Arita, M., & Fiehn, O. (2017). Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods* 2017 15:1, 15(1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Liigand, P., Kaupmees, K., Haav, K., Liigand, J., Leito, I., Girod, M., Antoine, R., & Krueve, A. (2017). Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. *Analytical Chemistry*, 89(11), 5665–5668. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B00096/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-000969_0003.JPEG

- Lima, A. da C. (2008). *Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em águas superficiais nos Rios Piracicaba e Doce, Ipatinga - MG, utilizando a técnica de EFS - CLAE - DAD*. Universidade Federal de Ouro Preto.
- Liu, Z., Tu, M. J., Zhang, C., Jilek, J. L., Zhang, Q. Y., & Yu, A. M. (2019). A reliable LC-MS/MS method for the quantification of natural amino acids in mouse plasma: Method validation and application to a study on amino acid dynamics during hepatocellular carcinoma progression. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1124, 72. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.05.039>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lynn, K. S., Cheng, M. L., Chen, Y. R., Hsu, C., Chen, A., Lih, T. M., Chang, H. Y., Huang, C. J., Shiao, M. S., Pan, W. H., Sung, T. Y., & Hsu, W. L. (2015). Metabolite identification for mass spectrometry-based metabolomics using multiple types of correlated ion information. *Analytical Chemistry*, 87(4), 2143–2151. <https://doi.org/10.1021/ac503325c>
- Mak, J., Cowan, T. M., & Le, A. (2019). Quantitative Analysis of Underivatized Amino Acids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2030, 85–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1_8
- Março, P. H., Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., & Tauler, R. (2014). Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: Descrição, funcionamento e aplicações. In *Química Nova* (Vol. 37, Issue 9, pp. 1525–1532). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140205>
- Martín-Blázquez, A., Díaz, C., González-Flores, E., Franco-Rivas, D., Jiménez-Luna, C., Melguizo, C., Prados, J., Genilloud, O., Vicente, F., Caba, O., & Pérez del Palacio, J. (2019). Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55952-8>
- Matthias Peter Roeser, H., & Angelika Roeser, P. (2010). O QUADRILÁTERO FERRÍFERO -MG, BRASIL: ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA, SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS AMBIENTAIS RELACIONADOS. *GEONOMOS*, 18(1), 33–37.
- Melvin, S. D., Lanctôt, C. M., Doriean, N. J. C., Carroll, A. R., & Bennett, W. W. (2018). Untargeted NMR-based metabolomics for field-scale monitoring: Temporal reproducibility and biomarker discovery in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a metal(loid)-contaminated wetland. *Environmental Pollution*, 243, 1096–1105. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.071>
- Mor, N. C., Correia, B. S. B., Val, A. L., & Tasic, L. (2020). A protocol for fish lipid analysis using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(4), 662–672. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190230>
- Nardecchia, A., & Duponchel, L. (2020). Randomised SIMPLISMA: Using a dictionary of initial estimates for spectral unmixing in the framework of chemical imaging. *Talanta*, 217, 121024. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121024>
- Nuran Ercal, B. S. P., Hande Gurer-Orhan, B. S. P., & Nukhet Aykin-Burns, B. S. P. (2005). Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529–539. <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>
- Ortiz-Villanueva, E., Benavente, F., Piña, B., Sanz-Nebot, V., Tauler, R., & Jaumot, J. (2017). Knowledge integration strategies for untargeted metabolomics based on MCR-ALS analysis of CE-MS and LC-MS data. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 978). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.049>

- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018a). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 635, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>
- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018b). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 635, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>
- Ortiz-Villanueva, E., Navarro-Martín, L., Jaumot, J., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Piña, B., & Tauler, R. (2017). Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach. *Environmental Pollution*, 231, 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.095>
- Pérez-Cova, M., Bedia, C., Stoll, D. R., Tauler, R., & Jaumot, J. (2021). MSroi: A pre-processing tool for mass spectrometry-based studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 215(April). <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104333>
- Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J. P., Morla, A., & Bouchu, D. (2003). ESI-MS/MS analysis of underivatised amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 17(12), 1297–1311. <https://doi.org/10.1002/RCM.1054>
- Quadra, G. R., Roland, F., Barros, N., Malm, O., Lino, A. S., Azevedo, G. M., Thomaz, J. R., Andrade-Vieira, L. F., Praça-Fontes, M. M., Almeida, R. M., Mendonça, R. F., Cardoso, S. J., Guida, Y. S., & Campos, J. M. S. (2019). Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. *Chemosphere*, 215, 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.104>
- Rivera, R., & Garrido, N. (2018). Metabolomics. In *Oxidants, Antioxidants, and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 277–285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00025-0>
- Rochat, B., Mohamed, R., & Sottas, P. E. (2018). LC-HRMS metabolomics for untargeted diagnostic screening in clinical laboratories: A feasibility study. *Metabolites*, 8(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/metabo8020039>
- Rodrigues, A. S. de L., Malafaia, G., Costa, A. T., & Nalini Júnior, H. A. (2014). Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte River basin, Minas Gerais State, Brazil. *Environmental Earth Sciences*, 71(9), 4177–4186. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2808-y>
- Rotchell, J. M., & Ostrander, G. K. (2003). Molecular Markers of Endocrine Disruption in Aquatic Organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6(March 2012), 453–495. <https://doi.org/10.1080/10937400390223430>
- Sales, N. G., Mariani, S., Salvador, G. N., Pessali, T. C., & Carvalho, D. C. (2018). Hidden Diversity Hampers Conservation Efforts in a Highly Impacted Neotropical River System. *Frontiers in Genetics*, 9(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00271>
- Salihovic, S., Broeckling, C. D., Ganna, A., Prenni, J. E., Sundström, J., Berne, C., Lind, L., Ingelsson, E., Fall, T., Ärnlov, J., & Nowak, C. (2020). Non-targeted urine metabolomics and associations with prevalent and incident type 2 diabetes. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72456-y>

- Scholz, S., & Mayer, I. (2008). Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293(1–2), 57–70.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.008>
- Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F. F., & Batista, B. L. (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27(99), 916–921.
- Tada, I., Tsugawa, H., Meister, I., Zhang, P., Shu, R., Katsumi, R., Wheelock, C. E., Arita, M., & Chaleckis, R. (2019). Creating a reliable mass spectral–retention time library for all ion fragmentation-based metabolomics. *Metabolites*, 9(11).
<https://doi.org/10.3390/metabo9110251>
- Tauler, R. (2021). Multivariate curve resolution of multiway data using the multilinearity constraint. *Journal of Chemometrics*, 35(2), 1–24. <https://doi.org/10.1002/cem.3279>
- Tauler, R., Gorrochategui, E., Jaumot, J., & Tauler, R. (2015). A protocol for LC-MS metabolomic data processing using chemometric tools. *Protocol Exchange*, 1–28.
<https://doi.org/10.1038/protex.2015.102>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., Vanderghenst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods* 2015 12:6, 12(6), 523–526.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Tsugawa, H., Ikeda, K., Takahashi, M., Satoh, A., Mori, Y., Uchino, H., Okahashi, N., Yamada, Y., Tada, I., Bonini, P., Higashi, Y., Okazaki, Y., Zhou, Z., Zhu, Z. J., Koelmel, J., Cajka, T., Fiehn, O., Saito, K., Arita, M., & Arita, M. (2020). A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nature Biotechnology* 2020 38:10, 38(10), 1159–1163. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2>
- Verhoeven, A., Giera, M., & Mayboroda, O. A. (2020). Scientific workflow managers in metabolomics: an overview. *Analyst*, 145(11), 3801–3808.
<https://doi.org/10.1039/D0AN00272K>
- Violi, J. P., Bishop, D. P., Padula, M. P., Steele, J. R., & Rodgers, K. J. (2020). Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 131, 116018.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.116018>
- WATERS. (2009, August). *Gradient Separation of Amino Acids on ACQUITY UPLC BEH HILIC* / Waters. Application Note WA60134.
<https://www.waters.com/nextgen/en/library/application-notes/2009/gradient-separation-of-amino-acids-on-acquity-uplc-beh-hilic.html>
- Watson, A. D. (2006). Thematic review series: Systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 47(10), 2101–2111.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R600022-JLR200>
- Weber, A. A., Sales, C. F., de Souza Faria, F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2020). Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>

- Xiao, J. F., Zhou, B., & Ressom, H. W. (2012). Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry : TRAC*, 32, 1. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.08.009>
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Kim, B. S. M., Carvalho, M. U., Figueira, R. C. L., Cavalcante, R. M., Grassi, M. T., & Abessa, D. M. S. (2022). Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster. *Data in Brief*, 45, 108715. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108715>
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. F. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Figueira, R. C. L., Cavalcante, R. M., Grassi, M. T., & Abessa, D. M. S. (2023). Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 9, 100250. <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2023.100250>
- Yamamoto, F. Y., Souza, A. T. C., Paula, V. de C. S. de, Beverari, I., Garcia, J. R. E., Padial, A. A., & de Souza Abessa, D. M. (2022). From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Science of the Total Environment*, 846(July), 157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>
- Yang, Z., Anacleto, J., & Maljers, L. (2014). Positive-Negative Switching LC–MS–MS for Quantification of Pesticides in Juice. *Column*, 10(18), 9428–9435. <https://doi.org/10.1021/JF503468T>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>

Table 1. Regions of Interest (ROI) parameters

Regions of Interest (ROI) Algorithm Parameters		
	Aa standard mix	Fish embryo samples
Signal intensity threshold	5,000 (~ 0.1%)	10,000 (~ 0.5%)
Factor signal (x threshold)	1	1
Mass error tolerance	0.005	0.005
Mass units	Daltons	Daltons
m/z values calculation	Median	Median
Minimum occurrence	5	5

Table 2. ROIMCR results of the analysis of the amino acids' standard and the fish embryo samples for each acquisition mode performed separately and simultaneously.

Dataset ¹	Nr of ROIs	Nr of ROIs selected ⁶	Constraints	R ²	Fitting error (PCA)	Fitting error (exp)	N components
DMS1+ aa	351	76	Non-negat.	99.994	0.463	0.767	30
DMS2+ aa	911	86	Non-negat.	99.909	1.563	3.017	30
DMS12+ aa	1262	162	Non-negat.	99.971	0.719	1.699	30
DMS1- aa	445	83	Non-negat.	99.99	0.721	0.997	30
DMS2- aa	723	78	Non-negat.	99.936	1.476	2.523	30
DMS12- aa	919	161	Non-negat.	99.875	1.781	3.527	30
DMS12+- aa	2181	323	Non-negat.	99.595	4.663	6.363	30
DMS1+ samp	1023	200	Non-negat.	99.997	0.455	0.567	100
DMS2+ samp	1100	200	Non-negat.	99.989	0.828	1.018	100
DMS12+ samp	2123	400	Non-negat.	99.978	0.979	1.487	100
DMS1- samp	687	115	Non-negat.	99.996	0.567	0.579	100
DMS2- samp	727	74	Non-negat.	99.995	0.646	0.648	70
DMS12- samp	1414	189	Non-negat.	99.981	1.285	1.381	100
DMS12+- samp	1055	589	Non-negat.	99.892	2.372	3.279	100

Table 3. Detection parameters of the seventeen amino acids and of the two additional internal standards analyzed in the analytical amino acids standard solution, with their exact and experimental mass and their intensity values for each ionization mode (positive and negative) and their chromatographic retention times. The last column summarizes the detection of the amino acid (or internal standard) in the simultaneous data analysis of the positive and negative modes.

		POSITIVE			NEGATIVE				
		[H ⁺] exact mass	[H ⁺] accu. mass	Intensity	[H ⁻] exact mass	[H ⁻] accu. mass		RT (min)	Pos/ Neg
1	Aminoacids								
1	L-Phenylalanine	166.0868	166.0846	1091678	164.0712	164.0671	584228	2.82	x
2	L-Isoleucine	132.1025	132.1007	1562956	130.0868	130.0837	223230	2.89	x
3	L-Leucine	132.1025	132.1007	1562956	130.0868	130.0837	223230	2.89	x
4	L-Tyrosine	182.0817	182.0793	441574	180.0661	180.0616	677328	2.99	x
5	L-Methionine	150.0589	150.0569	946572	148.0432	148.0395	816872	3.03	x
6	L-Valine	118.0868	118.0853	775806	116.0712	ND	ND	3.24	x
7	<i>Methionine Sulfone</i>	182.0487	182.0463	120358	180.03305	180.0284	808366	3.34	x
8	Glycine	76.03986	ND	ND	74.0242	74.0223	286062	3.58	x
9	L-Threonine	120.0661	120.0645	95528	118.0504	118.0474	919562	3.58	x
10	<i>PIPES</i>	303.0684	303.0643	82214	301.05281	301.0448	611436	3.58	x
11	L-Proline	116.0712	116.0697	4609182	114.0555	ND	ND	3.61	x
12	L-Serine	106.0504	106.0492	38116	104.0348	104.0322	813598	3.72	x
14	L-Alanine	90.05551	90.0543	70432	88.0399	88.0375	16284	5.49	x
13	L-Glutamic acid	148.061	148.0592	96378	146.0453	146.0415	617628	4.00	x
15	L-Aspartic acid	134.0453	134.0438	8814	132.0297	132.0262	57966	5.49	x
16	L-Arginine	175.1195	175.1174	2055464	173.1039	173.0992	195606	6.14	x
17	L-Lysine	147.1134	147.1116	420304	145.0977	145.0939	37522	6.39	x
18	<i>Cystine</i> *	241.0316	ND	ND	239.0160	239.0098	8722	6.49	
19	L-Histidine	156.0773	156.0752	146004	154.0616	154.0577	129352	7.08	x

Table 4. The fragment ions corresponding to MS2 found for each amino acid in the positive and negative mode with the ROIMCR approach in the amino acid' mixture standard.

Aminoacids	- mz MS2 [+]	mz MS2 [-]
NEGATIVE		
Glycine	-	74,0223; 72,00671
L-Alanine	90,0543	88,0374; 74,02239
L-Serine	106,0492; 60,0441; 88,0387	104,0321; 61,98615; 88,0375
L-Proline	116,0697; 70,065	-
L-Valine	118,0853; 72,0802	-
L-Threonine	120,0653; 70,0646	118,0474; 74,02232
L-Isoleucine	132,1007	
L-Leucine	132,1007; 86,096	
L-Aspartic acid	134,0434; 84,9591	132,031; 88,0376; 114,999
L-Lysine	147,1116; 121,9651	145,0939; 137,9106
	148,0592; 84,0436; 130,0489;	
L-Glutamic acid	102,0546	146,0415; 128,0314; 102,0529
L-Methionine	150,057; 133,0306; 104,0519	148,0397; 112,9824
	156,0752; 110,0704; 83,0597	154,0577; 93,046; 137,0312;
L-Histidine		110,069; 80,0356
	166,0846; 120,0797; 103,0533;	
L-Phenylalanine	86,09583	164,0671; 147,041; 72,0069
	175,1174; 70,0648; 116,0697;	
L-(+)-Arginine	130,0965; 60,05525; 158,092	173,0992; 131,0787; 146,9567
	182,0794; 136,0743; 123,043;	148,0395; 180,0615; 154,943;
L-Tyrosine	165,053; 91,0535	130,0838; 163,0355; 119,0468
L-Cystine	-	
Methionine Sulfone	136,0466	180,0284; 78,9835; 63,9604
	70,0646; 303,0646; 152,0362;	
PIPES	195,0779	301,0446; 193,0597

Figure 1 Workflow of the ROIMCR analysis for the identification of amino acids in standard solution or fish embryo samples, through arranged datasets of positive and negative modes of ionization. For each mode of acquisition, both MS1 and MS2 datasets are also combined to facilitate the identification of the features.

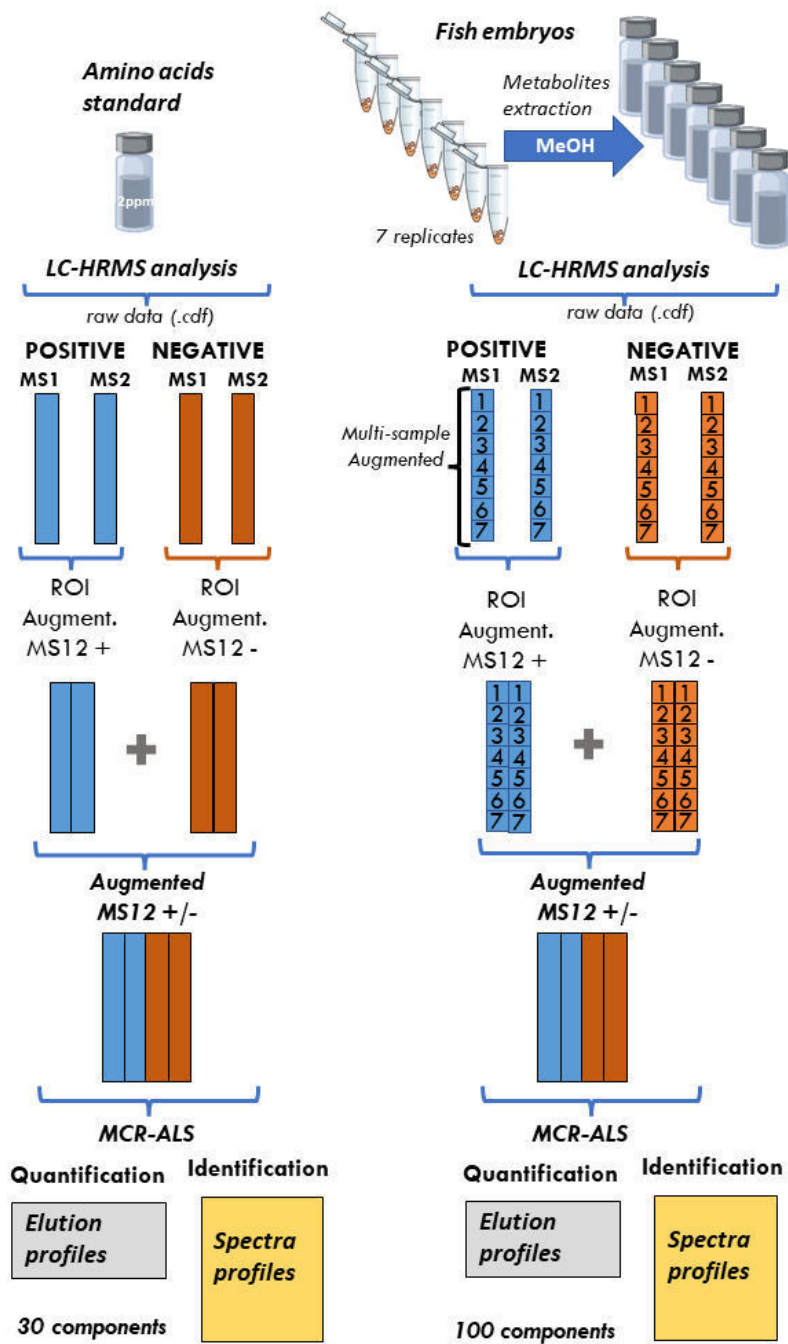
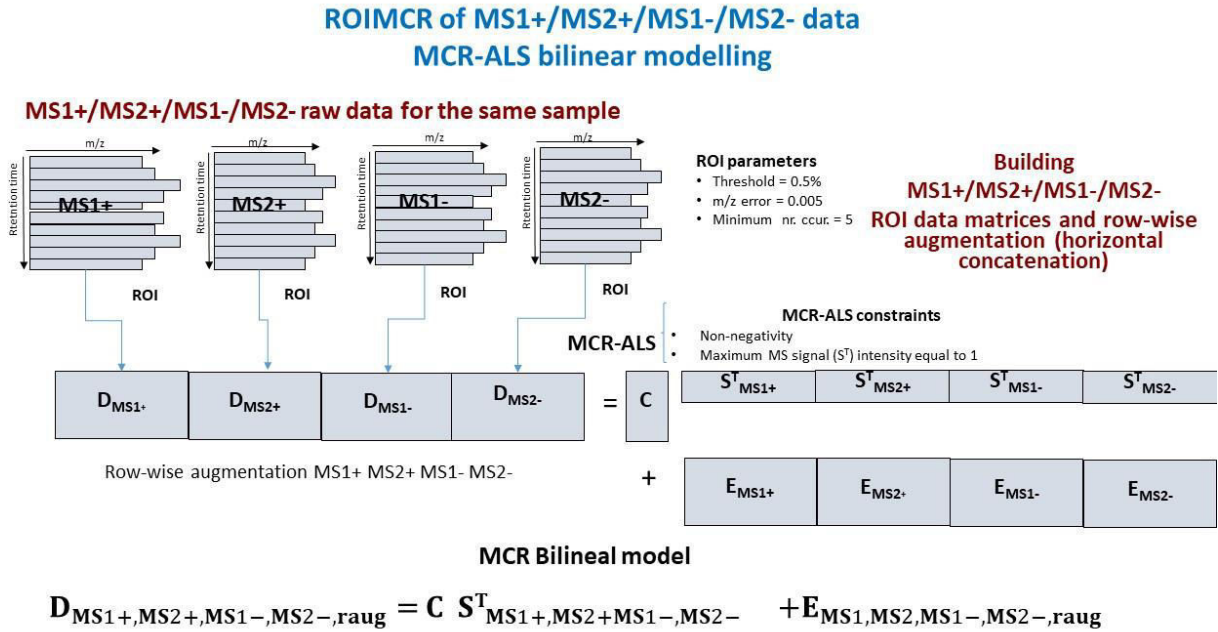


Figure 2. Illustration of the data matrix augmentation of MS1(+), MS2(+), MS1(-) and MS2(-) acquisitions in the amino acids standard mixture by the ROIMCR procedure.



26

Figure 3. Illustration of the data matrix augmentation of MS1(+), MS2(+), MS1(-) and MS2(-) acquisitions in the multiset data of the fish embryo samples replicates by the ROIMCR procedure.

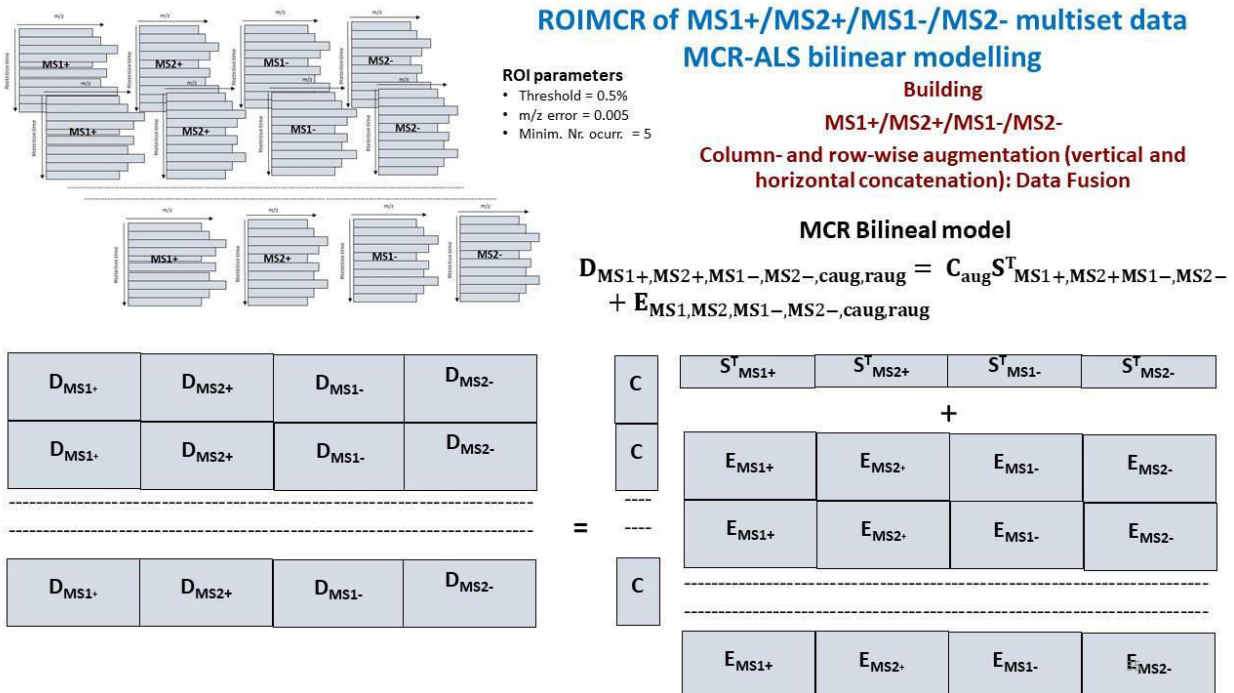


Figure 4. ROIMCR resolution of the elution profiles (C matrix in Equation 4) of the amino acids in its standard mixture analyzed by LC-HR MS1 MS2 DIA in positive and negative ionization modes

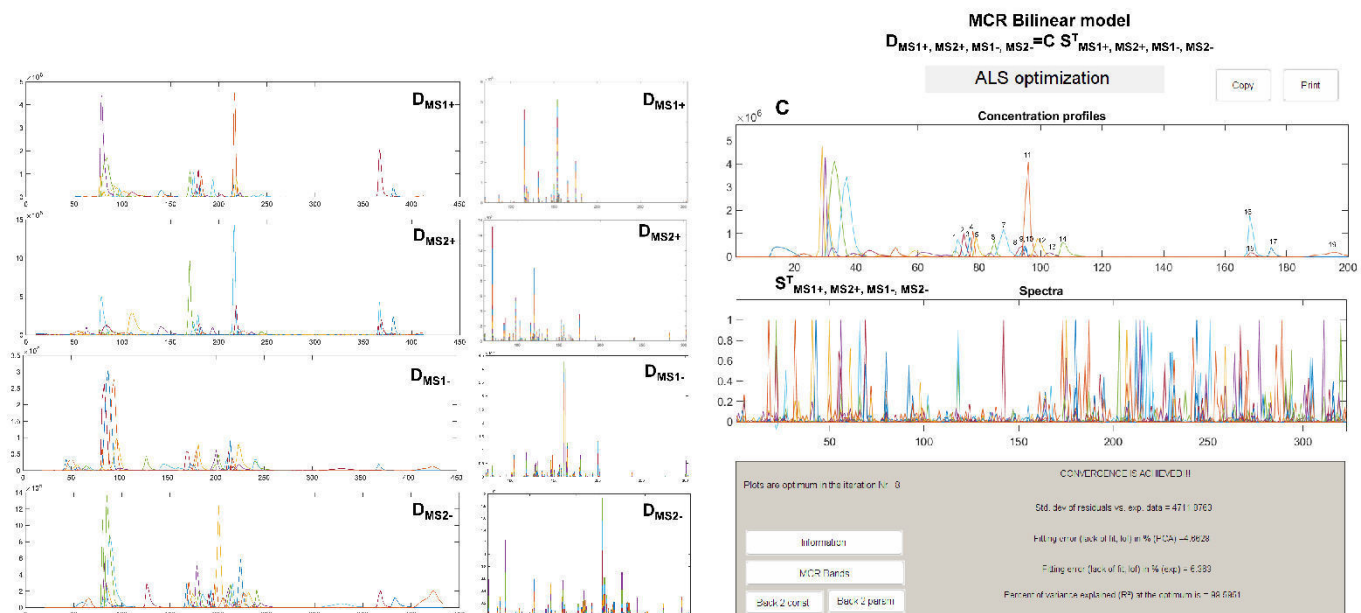


Figure 5. Graphical illustrations of the elution and spectra profiles of two different amino acids obtained by the ROIMCR approach, with simultaneous data analysis of MS and MS/MS DIA in positive and negative acquisition modes. Upper left, molecular formula of the identified amino acid. Lower left, ROIMCR elution profiles of the amino acid vs scan number (upper) and vs retention time (lower). Upper right more significant m/z in MS1 and MS2 signals. Lower right MS1(+), MS2(+), MS1(-) and MS2(-) ROIMCR resolved spectra profiles with the m/z values of their more intense signals.

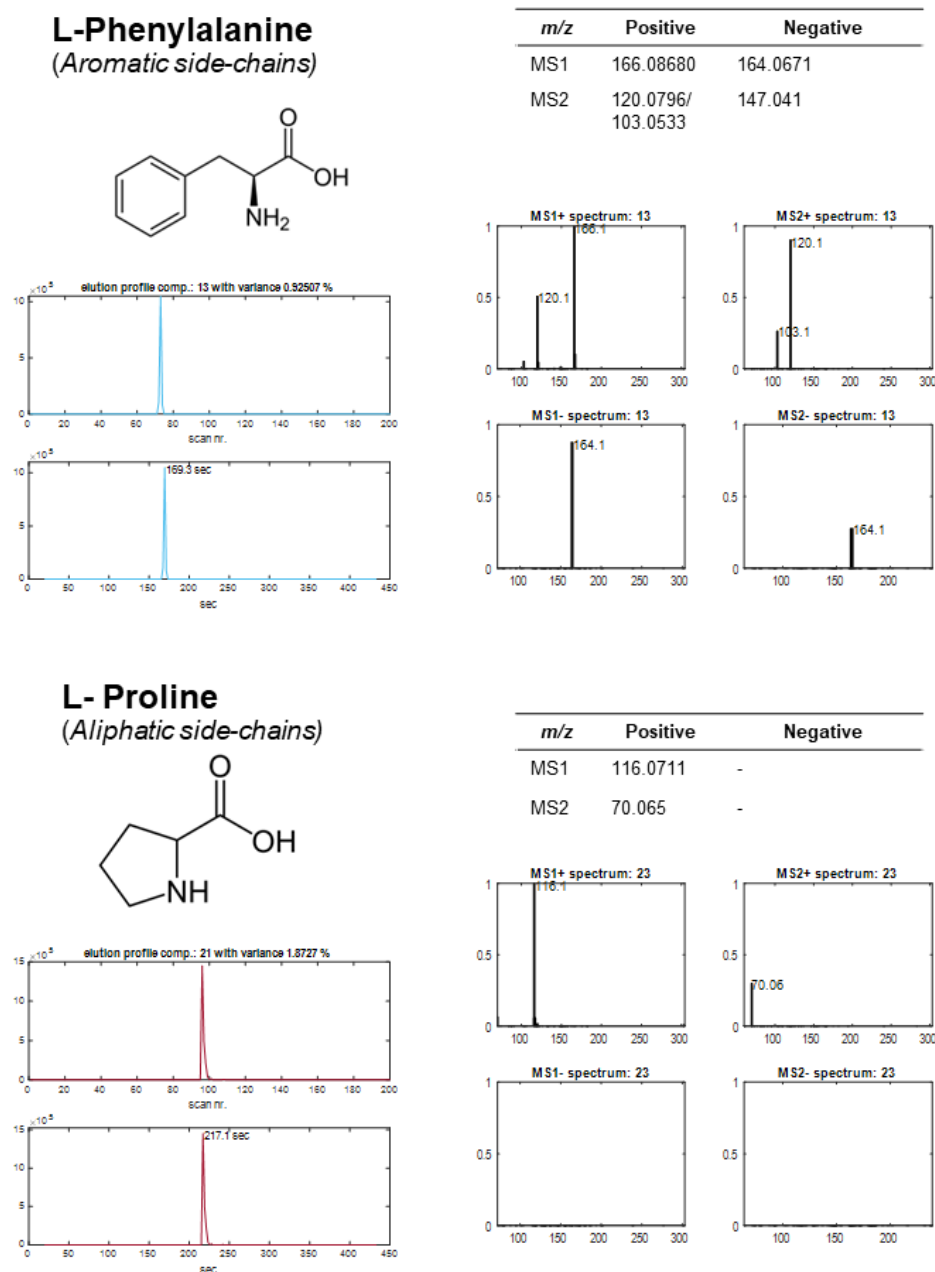


Figure 6. ROIMCR resolution of the elution profiles (C matrix in Equation 4) of the metabolites in the fish embryo samples analyzed by LC-HR MS1 MS2 DIA in positive and negative ionization modes

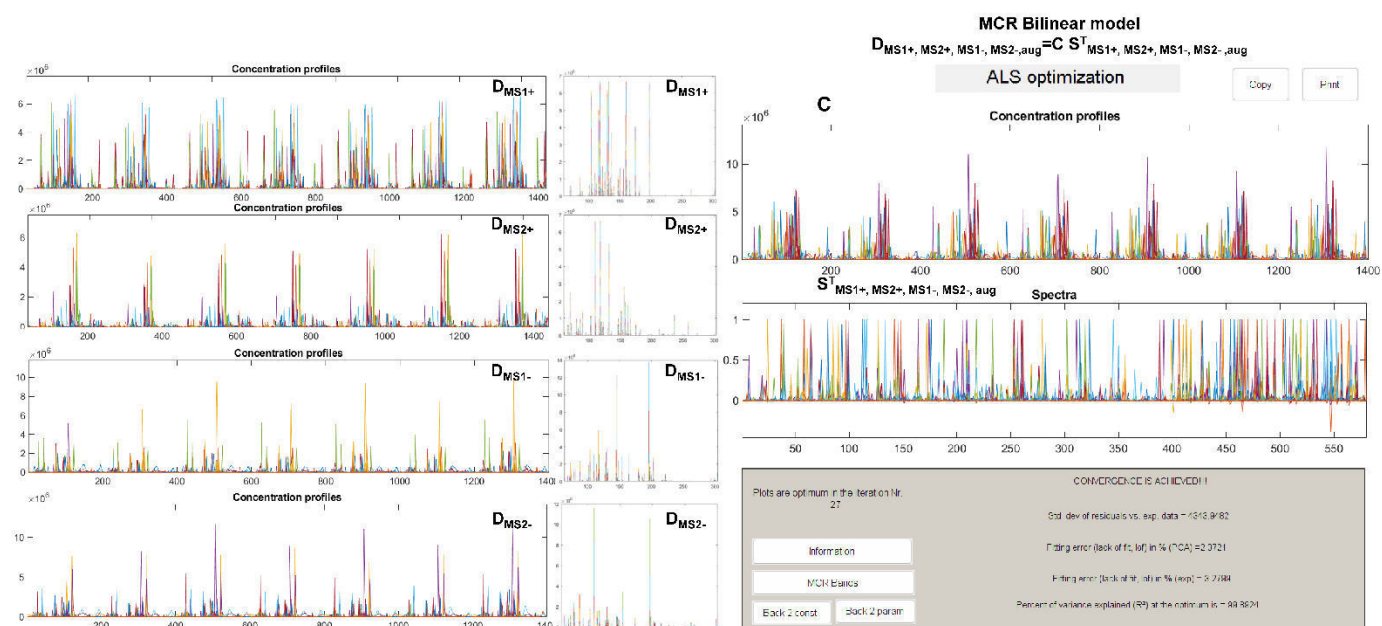
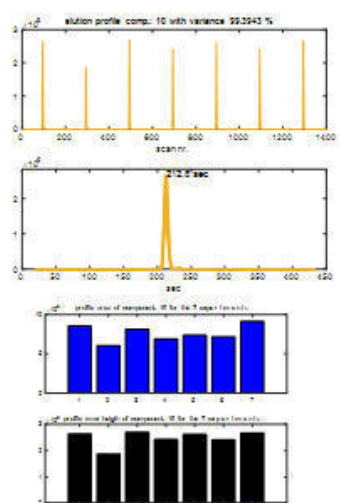
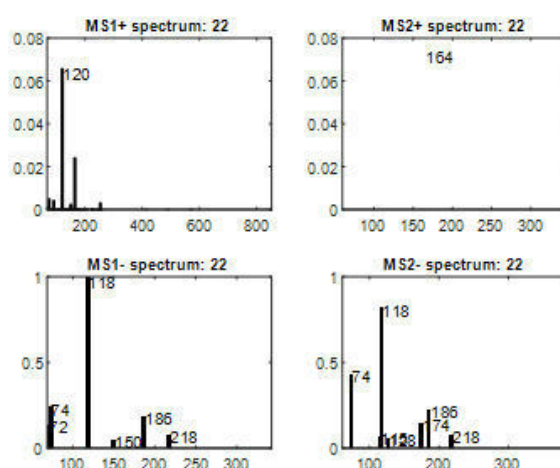


Figure 7. Graphical illustrations of the elution and spectra profiles of two different amino acids detected in the fish embryo samples, obtained by the ROIMCR approach, with simultaneous data analysis of MS and MS/MS DIA in positive and negative acquisition modes. Upper left, ROIMCR elution profiles of the amino acid vs scan number (upper) and vs retention time (lower). Lower left, the profile area and maximum height of the component for each sample replicate. Upper right more significant m/z in MS1 and MS2 signals. Lower right MS1(+), MS2(+), MS1(-) and MS2(-) ROIMCR resolved spectra profiles with the m/z values of their more intense signals.

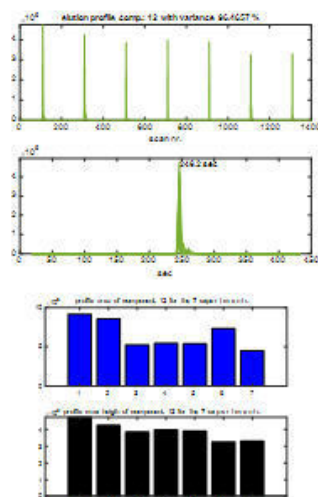
L-Threonine



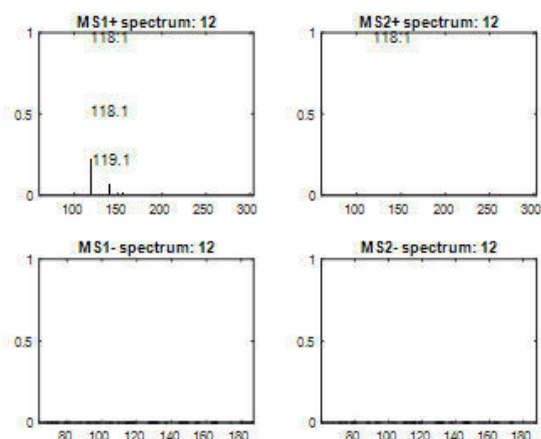
m/z	Positive	Negative
MS1	120.0660	118.0504
MS2	70.065	74.02232



L-Valine



m/z	Positive	Negative
MS1	118.0868	
MS2	72.0802	



Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of action of environmental complex mixtures from Doce River in Brazilian fish embryos

Flávia Yoshie Yamamoto^{ab}, Larissa Ajala Batista^c, Mayara Padovan Santos^d, Carmen Bedia Girbés^a, Silvia Lacorte Bruguera^a, Marcos Tadeu Grassi^d, Denis Moledo de Souza Abessa^b, Romà Tauler^a

^a - Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Barcelona, Spain

^b - Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil.

^c - Department of Zoology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

^d - Chemistry Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Abstract

Mining and other essential economic activities have a long historical impact on aquatic environments, such as the Doce River Basin (DRB), in Brazil. High concentrations of metals combined with organic chemicals introduced from multiple sources of contaminants may trigger complex toxicity pathways which are difficult to interpret and distinguish. For unveiling mechanisms of toxicity, LC-HRMS-based metabolomics combined with the ROIMCR approach for data analysis can be a powerful approach in field-scale monitoring studies, helping to properly comprehend the biological responses of environmental stressors. This study aimed to investigate mechanisms of toxicity of environmental chemicals from DRB using a comprehensive untargeted LC-HRMS metabolomics approach (data-independent acquisition of all ion-fragmentation mode), in fish embryos (*Rhamdia quelen*) exposed to chemical mixtures. To solve the problem of the complex mixtures generated by the large-scale datasets of mass spectra (MS/MS), the ROIMCR approach was applied to compress and resolve the data. Fish embryos exposed for 96h to 6 treatment groups showed a distinct pattern of responses when compared to controls, with downregulated essential metabolites, such as amino acids, as a main response, especially for metal exposure. Unexpectedly, the combination of organic contaminants extracted from sediments with inorganic elements showed reduced toxicity than isolated metal mixtures. The results helped to identify and distinguish the effects of different classes of environmental chemicals when combined as complex mixtures. HRMS combined with the ROIMCR approach represents a suitable strategy for metabolomics-derived data to identify and distinguish the effects of different classes of environmental chemicals and could be applied not only for the DRB assessment but also in other aquatic ecosystems.

INTRODUCTION

Mining industries are essential for providing mineral resources to every sector of the economy but are also responsible for generating considerable environmental impacts such as vegetation suppression and chemical contamination due to the disposal of mining wastes. In Brazil, historical intensive mining activities related to the extraction of gold and iron, as in the case of the Doce River Basin, have led to significant contamination of waterbodies with metals, including mercury, arsenic, iron, and manganese (Borba et al., 2003; Matthias Peter Roeser & Angelika Roeser, 2010; Rodrigues et al., 2014).

In 2015, the breakage of a dam from a large-scale mining company (Samarco) introduced around 50 million liters of iron tailing wastes into the Doce River basin, being considered one of the worst environmental tragedies in Brazil (ANA, 2015; Fernandes et al., 2016; Hatje et al., 2017; IBAMA, 2015; Sales et al., 2018). Several studies reported high levels of iron and manganese dissolved in waters and sediments, as well as the detection of toxic elements such as Hg, As, and Cd above the limits established by legislation (CPRM, 2015; Dias et al., 2018; Hatje et al., 2017; Quadra et al., 2019; Segura et al., 2016; Weber et al., 2020).

Additional human activities, such as steel mill industries, wastewater effluents without treatment, and crops, are also found along the Doce River and may also represent significant sources of pollution to this waterbody (ANA, 2015). However, while metal contamination has been widely reported by different studies, the occurrence of organic chemicals, such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HPAs) is still poorly investigated (Lima, 2008). Many of these chemicals may pose a great risk to biota, and their effects can be enhanced in complex mixtures containing both organic and inorganic chemicals (Backhaus & Blanck, 2010; Gauthier et al., 2014; Jacobsen et al., 2012; Jarvis et al., 2014).

Molecular analysis tools are valuable for unveiling mechanisms of toxicity, allowing to distinguish pathways triggered by organic and inorganic chemicals (Rotchell & Ostrander, 2003; Scholz & Mayer, 2008). Among the omics sciences, metabolomics has become an alternative and promising approach in environmental toxicology and exposure assessment, allowing for the identification of novel biomarkers and elucidation of mechanisms of toxicity in more ecological representative organisms (Bouhifd et al., 2013; Koelmel et al., 2020b). Unlike genomics and proteomics, metabolomics directly reflects the underlying biochemical activity and state of cells, being considered as the endpoint of the “omics” cascade, thus better predicting the molecular

phenotype (Clish, 2015; Dettmer & Hammock, 2004). Additionally, smaller variations in gene expression and protein synthesis might result in an amplified change in the metabolite profile, which can be studied to detect subtle cellular events (Rivera & Garrido, 2018). Thus, metabolomics can provide “a comprehensive understanding of the influence of all small molecular weight biomolecules on a biological system concerning cell signaling, membrane architecture, transcriptional and translational modulation, cell-cell and cell-protein interactions, and other responses to environmental changes over time” (Watson, 2006).

High-resolution Mass spectrometry is one of the most commonly used techniques in untargeted metabolomics, that can contribute greatly towards elucidating mechanisms of toxicity in field studies within ecotoxicology, being more sensitive than Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy (Castro & Griffin, 2020; Melvin et al., 2018; Mor et al., 2020). This has been highlighted in recent examples showing the versatility of this technique as a promising tool for environmental monitoring studies (Martín-Blázquez et al., 2019; Ortiz-Villanueva, Benavente, et al., 2017; Ortiz-Villanueva et al., 2018b; Rochat et al., 2018).

In addition to the known metabolites studied in the targets approach, the non-supervised metabolomics approach with data-independent acquisition may allow the discovery of unknown metabolites, assessing a higher broad range of small molecules in biological samples. However, the complex datasets originating from LC-MS-based metabolomics and other omics approaches represent a great challenge in bioinformatics data analysis, requiring a proper strategy to solve the mixture analysis problem. Currently, the ROIMCR approach is considered a suitable strategy for unsupervised metabolomics studies, where large datasets are firstly filtered and compressed, followed by the increase of data resolution, without losing original information (Ortiz-Villanueva, Benavente, et al., 2017; Ortiz-Villanueva et al., 2018a; Ortiz-Villanueva, Navarro-Martín, et al., 2017).

Therefore, in the current study, unsupervised metabolomics was applied as a comprehensive approach for clarifying and distinguishing discrete mechanisms triggered by metals and organic chemicals, allowing the identification of different pollution sources from Doce River in exposed organisms. Additionally, a native fish species from the Doce River was used as a more ecologically relevant organism that could respond similarly in a real condition of exposure that occurs in the Doce River.

MATERIALS AND METHODS

Treatment groups

The experimental design was performed for characterizing and distinguishing responses induced by metals, organic chemicals, and their mixtures based on expected conditions found in the Doce River. Six treatment groups (2 of metals, 2 of organics, 2 of their mixtures) and two control groups were used to achieve this (Figure 1):

- 1) 1 MET - Mixture of major metals from mining activities detected at the Upper Doce River Basin (Fe, Mn, As, Hg). Higher concentrations of essential **metals** iron (Fe) and manganese (Mn) – Fe and Mn are the most abundant transition metals found in the Doce River, mainly at the headwaters (Upper Doce River), introduced mainly by iron ore exploitation, and were abundant in the iron tailing waste from the Fundão dam disaster. Low concentrations of non-essential elements, the **metal(loid)s** arsenic (As), and mercury (Hg) were historically introduced by gold ore exploration.
- 2) 2 MET- Mixture of metals from mining activities (mixture 1 of Fe, Mn, As, Hg), combined with other trace elements detected at the Middle and Lower Doce River Basin (Al, Ti),
- 3) 3 ORG - Mixture of organic chemicals extracted from the sediments of Governador Valadares city (Middle Doce River, industrial and domestic effluents with poor treatment system)
- 4) 4 ORG - Mixture of organic chemicals extracted from the sediments of Colatina city (Lower Doce River, agricultural and livestock impact in addition to domestic and industrial effluents)
- 5) 5 MIX - Mixture of inorganics from **mixture 2** + mixture of organics from **mixture 3**
- 6) 6 MIX - Mixture of inorganics from **mixture 2** + mixture of organics from **mixture 4**
- 7) 7 CT - Negative control with reconstituted water
- 8) 8 CS- Solvent control with acetone 0.0026% (used to prepare organic mixtures)

The negative control as well as all treatment solutions were prepared with reconstituted water (CaCl₂ 294.0 mg L⁻¹, MgSO₄ 123.3 mg L⁻¹, KCl 5.7 mg L⁻¹ and NaHCO₃ 64.7 mg L⁻¹) according to OECD 203 guidelines (1992).

Considering the sources of pollution along the river path, it was expected that contaminant profiles will include inorganic chemicals from mining activities combined with organic chemicals

such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HPAs) from steel mill industries, emerging contaminants including pharmaceuticals from domestic effluents, and pesticides from agricultural activities, as reported by (Yamamoto et al., 2023).

Stock solutions of inorganic chemicals were previously prepared (Fe 0.3 g L⁻¹; Mn 0.1 g L⁻¹; As 0.3 mg L⁻¹; Hg 0.2 mg L⁻¹; Al 0.1 g L⁻¹; Ti 0.01 g L⁻¹, dilutions from original standards AccuStandard®) in ultrapure water and sonicated 3 times of 9 min. On the same day of the experiment, stock solutions were diluted (1000x) to achieve desired concentrations. Final concentrations of inorganic chemicals used for treatment groups (Fe 0.3 mg L⁻¹; Mn 0.1 mg L⁻¹; As 0.3 µg L⁻¹; Hg 0.2 µg L⁻¹; Cd 0.2 µg L⁻¹) were determined according to the limits established by national legislation (CONAMA), even with exceeding levels detected in the water sampled in the Doce River in 2019 (Yamamoto et al., 2022, 2023).

Organic chemicals from treatment groups 3 and 4 were extracted from 15 g of lyophilized sediment samples from Doce River, sampled in 2019 (Yamamoto et al. 2022), according to the method of Cavalcante et al., (2007). Briefly, 25 ml each of solvent (acetone, ethyl acetate, dichloromethane, and hexane, and a mixture of the four solvents in the same proportion) were added, and the sample was ultrasonicated for 20 min. After being sonicated, the sample was centrifuged at 4000 rpm for 15 min and subsequently concentrated in a rotary evaporator to a final volume of 1 ml of acetone. The organic extracts were diluted in reconstituted water according to calculations considering limits established by EPA (BaP 0.2 µg L⁻¹) and also original concentrations in the environment (0.0026% for mixture 3 and 0.0012% for mixture 4). Finally, groups 5 and 6 reflected the chemical mixtures containing both inorganic and organic chemicals found along the Doce River.

Physicochemical parameters were measured before the test initiation and for every change of water for reaching optimal conditions (pH ~7.0, DO₂ >85%, Table in Supplementary Material).

Embryo Toxicity assay

Acute toxicity tests with fish embryos of *Rhamdia quelen* were performed according to OECD guidelines (236 Test, 2013), modified according to (Yamamoto et al., 2022), after the approval by the Ethics Committee on Animal Use (Protocol 01/2021 -CEUA/UNESP, CLP) for the proposed conditions of animal experimentation. Fish embryos were obtained by inducing three adult females (0.8±0.1 kg) and three male fish (5.5 mg.kg⁻¹ of fish) to reproduction in the Panama Fish Fam (Paulo Lopes, Brazil) in March 2021, according to Yamamoto et al., (2022). Transportation of eggs was performed in plastic bags filled with oxygen gas to the laboratory of Cell Toxicology (Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil). The solutions of each treatment

group were added to 24-well microplates (2 mL per well) for analysis of survival and deformities rates, and in glass beakers of 250 ml for metabolomics analysis (200 ml per beaker). Viable embryos (fertility rate >80%) in the gastrula stage (8hpf) were selected and added to the microplates (one embryo per well) and beakers (120 embryos per beaker) containing the previously added solutions. Survival rates and deformities were analyzed in 5 replicates (5 microplates per treatment) every 24hpf. For the metabolomics analysis, 5 replicates were obtained (5 beakers for each treatment and control group) after 96hpf of exposure. Every 24h the water or solution was partially changed (100 μ L for each well; 100 ml per beaker), in a semi-static system of exposure, at room temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), and lethality was checked according to the observation of: i) coagulated eggs; ii) lack of somite formation; iii) non-detachment of the tail; iv) lack of heartbeat. After this period of 96hpf, the embryos were anesthetized at -20°C and pooled into a microtube of 2 mL (a full beaker for each microtube, containing approximately 50 embryos) and stored at -80°C for further metabolomics analysis. The frozen samples were transported to the Institute of Environmental Assessment and Water Research (Barcelona, Spain) under dry ice ($<-20^{\circ}\text{C}$), for the metabolomics analysis.

Metabolomics

Chemicals

All standards and salt reagents used for the metabolomics analysis were purchased from Sigma-Aldrich®. The solvents (methanol, acetonitrile, chloroform) and water used for LC-HRMS were purchased from FisherTM and were of high-purity analytical grade (UHPCL grade).

Metabolites extraction

Metabolites and lipids were extracted from 5 pooled samples (approximately 50 mg of lyophilized embryos) for each treatment group, according to the method proposed by Bligh, E.G., and Dyer, (1959) modified according to OrtizVillanueva et al. (2018).

The metabolites in the samples were extracted by adding 900 μ L of ice-cold methanol (Fisher) followed by vortexing for 15 s and homogenizing in a Tissue lyzer LT (Qiagen) for 4 min (40Hz). Samples were spiked with 10 μ L of methionine sulfone at 10 ppm. To improve the separation of metabolites and lipids, an additional hydrophobic phase was created by adding 500 μ L of water and 400 μ L of chloroform. The samples were vortexed for 15 s and remained sonicating for 10 min at a low temperature (ice bath) before centrifugation at 20,000g for 10 min at 4°C . The aqueous fraction containing the metabolites (upper phase) was separated from the

lower phase (containing lipids) and was evaporated under nitrogen gas flow. Samples were reconstituted in 450 μL of 1:1 acetonitrile: water (v/v) with the addition of 10 μL internal standards (PIPES, Acetylcholine, Dopamine at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). For removing potential residuals from extracted samples before injection, samples were centrifuged once more at 20,000 g for 5 min and stored in vials at -80°C until analysis. A Quality Control (QC) sample was prepared by pooling 10 μL of each sample from all treatments and controls. Figure 2 exemplifies the main procedures for obtaining the fish embryo samples, metabolite extraction, LC-HRMS analysis, and data analysis with the ROIMCR method.

Chromatographic separations

Chromatographic separations of metabolites were performed on a UPLC system (Bruker) using a hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) column (**ACQUITY UPLC BEH** column, 100 mm length, 2.1 mm diameter, 1.7 μm particle size) from Waters (Ireland) at 50°C . To improve chromatographic separations, only 2 μL of sample or standard were injected into the UHPCL at a flux of 0.4 mL/min. Separations of 10 min started with a gradient of elution of 99.9% of B1 mobile phase (**90:10 Acetonitrile/Water**, 10 mM ammonium formate + 0.2% formic acid) increasing to 75% in 4 min and 50% in 6 min. Concentrations of A1 (**50:50 Acetonitrile/Water**, 10 mM ammonium formate + 0.2% formic acid) reached 90% in 7 min and returned to 0.1% after 8 min.

Full scan mass (broadband collision-induced dissociation, bbCID) ranging from 60 to 1000 m/z was acquired with a High-Resolution Mass Spectrometry QTOF (Bruker Impact II) at a resolution of 50,000 FWHM. The ionization source operated independently both in positive (25 eV normalized collision energy, 4 eV of ion energy) and negative mode (30 eV normalized collision energy, 6 eV of ion energy), in separate runs with alternating MS scans of the precursor ions and all ion fragmentation. The capillary voltage was 2500 V, the nebulizer pressure of 2.0 Bar, the dry gas flow of 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, and the dry temperature of 200°C .

Data analysis

The LC-HRMS data were analyzed by different multivariate analyses, including the MCR-ALS, PCA, PLS-DA, ASCA, and Hierarchical clustering, for understanding the most significant changes in metabolite levels induced by the exposure to complex mixtures of chemicals.

Firstly, each LC-HRMS chromatographic run was converted to a NetCDF data file through the Compass DataAnalysis software 5.2 (Bruker, Germany) and imported into MATLAB R2020a environment (The Mathworks Inc. Natick, MA, USA) using the MSroi app in MATLAB according

to Pérez-Cova et al., (2021). The effects triggered by each treatment group were compared to its respective control group (negative control for metals treatment and solvent control for organics treatment). For this, multiple chromatographic runs (5 replicate samples of a treatment group + 5 replicates of control) were imported simultaneously (*importMSmulti* app) and were arranged as a column-wise augmented matrix (Figure 1). Before performing the ROI analysis, the MS1 and MS2 data from the augmented table were separated for each polarity mode of acquisition (positive and negative).

The dimensionality of the large-sized datasets was reduced through the “regions of interest” (MSROI approach) (Ortiz-Villanueva et al., 2017), which filters and selects the most relevant MS instrumental signals to compress the data sets without losing mass spectral accuracy. This strategy consists in selecting (“filtering”) relevant data according to specific criterias, including a particular threshold intensity, admissible mass error and minimum number of occurrences (Gorrochategui et al., 2019; Pérez-Cova et al., 2021). In this case threshold intensity was set to 0.1% of maximum intensity, mass error tolerance of 0.005 and minimum number of occurrences of 5.

After performing ROI, the MS1 and MS2 tables were arranged as a row-wise augmented matrix, according to Pérez-López et al. 2023, since they have the same retention time (number of rows). This newly arranged matrix was decomposed bilinearly into two matrices by the MCR-ALS analysis, for each mode of ionization positive and negative: one containing information regarding the elution profiles; and the other with mass spectra information for the identification of the resolved features (Figure 1). For each resolved component from ROIMCR, it was obtained peak areas and maximum heights for the estimation of their concentrations. The height values were selected instead of the total area since they gave more robust information related to the variation of the levels of the metabolites. After applying MCR-ALS, the resolved component peak heights were used to perform other multivariate analyses: PCA and PLSDA analysis, ASCA for statistical differences between treatment and control groups, and clustering.

Metabolite identification was performed based on the comparison with the accurate molecular mass of both MS1 and MS2 measured by LC-HRMS with their corresponding values found in online database resources, such as MassBank, METLIN Metabolite Database, and MetaCyc database. Additionally, the identification was further confirmed with the MS-DIAL software accordingly by checking the reference matched ions (MS1 and MS2 confirmed with literature databases, total score >850 in compound search information) and also considering suggested ions (only MS1 is confirmed).

RESULTS

Survival rates

The chemical exposure to the mixtures of inorganic and organic contaminants at environmental concentrations did not cause significant lethal effects in the fish embryos. The survival rate in the microplates ranged from 92 to 98% (Table 1). The reliability of the test was confirmed by the high percentage of survived individuals for the control groups (97% for negative control and 93 for solvent control).

When the exposure was performed in beakers, the survival rate decreased from 60 to 82%, but still without significant differences between groups.

Metabolomics

The LC-HRMS-based metabolomics approach combined with the ROIMCR method allowed the detection of more than 100 metabolites with different levels between the treatment groups when compared to the controls (Table 1). In general, all the treatment groups showed to downregulate most of the essential metabolites identified when compared to control groups, especially for 1 MET. The ASCA analysis revealed significant differences ($p \leq 0.01$, 1000 permutations) in metabolite levels for all treatment groups when compared to controls (Table 1), both when considering area and height values of acquisitions in the positive and the negative modes. The 3 ORG (negative) and 5 MIX (positive) showed slightly lower effects and higher p values (0.01 and 0.009 respectively) for the ASCA analysis, indicating the lower content of altered metabolites detected for these groups.

The metal exposure from 1 MET triggered the most significant effects when compared to the control group according to the ROIMCR procedure for ASCA and PCA analysis. From the 100 resolved components by the ROIMCR procedure for each acquisition mode (positive and negative) more than 52% were significantly different than controls. The majority of the significant metabolites were detected in the positive mode, except by the 6 Mix group, which predominated the detection of metabolites in the negative mode (65%).

In general, the PCA analysis explained approximately 70% of the variance of the data for all treatment groups vs. controls for both positive and negative modes. The groups 1 MET, 2 MET, and 6 MIX showed better discrimination of the treatment replicates from controls' (Figure 3), which is also supported by the higher rate of explained data variance for these groups ($>70\%$). For

the PC1, treatment groups presented more negative scores than controls, which is better visualized for the 1 MET group. Regarding the variables, the PC1 showed more positive loadings for most of the 100 resolved features (height values) obtained from ROIMCR (Figure 4). In other words, the control replicates (positive scores) were positively correlated to higher loadings representing the majority of the levels of the essential metabolites.

Although most of the essential metabolites showed downregulation in treatment groups when compared to controls, some metabolites were upregulated, such as hypoxanthine, inosine, and dopamine following metal exposure from 1 MET (Figure 5 and 6). In Figure 6 it is possible to observe the elution profiles and mass spectra of four resolved metabolites by the ROIMCR procedure in fish embryo samples of 1 MET treatment and controls. The neurotransmitter Choline showed slightly but significantly lower levels in fish embryos exposed to metals from 1 MET when compared to the controls. In the top left graph, the elution profiles of the multi-sample analysis are illustrated by the five first peaks representing the treatment replicates, followed by the other five peaks representing the control samples. Right above, the retention time of maximum intensity is described and the single peak evidences the good alignment of the ten samples, indicating that the different chromatographic runs showed similar elution patterns and that the ROIMCR procedure was capable of improving the resolution of this feature. Similarly, the amino acid taurine still in Figure 6 showed lower levels, but even more prominent in the treatment group, which is evidenced by the top right graphs illustrating the area and height of the resolved feature by the ROIMCR. Finally, the nucleosides hypoxanthine and inosine showed significantly higher levels in the 1 MET treatment group when compared to the controls.

The main group of metabolites with lower concentrations were the amino acids, with the aminoacyl-RNA biosynthesis pathway as one of the most affected in all treatment groups according to the MetaboAnalyst software (Figure 7, Table 2). Other commonly affected pathways amino acids-related included: arginine biosynthesis, Phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis; Histidine metabolism; Lysine degradation; Alanine, aspartate, and glutamate metabolism; Valine, leucine, and isoleucine degradation; and taurine and hypotaurine metabolism. The 1 MET group was the only one related to Pantothenate and CoA biosynthesis. On the other hand, purine metabolism, Cysteine, and methionine and glutathione metabolism were only significantly affected following exposure to organics contaminants. The potential effect in the citrate cycle was only observed for the 6 MIX treatment.

When Al and Ti were added to the metals from 1 MET (in 2 MET group), the toxicity was not enhanced, since the levels of metabolites were not significantly different than those of the 1

MET. In general, the exposure to the organic's mixtures altered less metabolite levels when compared to the metal exposure, but also induced significant effects in fish embryos.

Regarding the mixtures of inorganics and organics, it was observed a non-additive effect, since the organics have not increased the toxicity in the presence of the metals. However, it was possible to verify a differentiated response between 5 Mix and 6 mixes with the latter group triggering more effects than the former (28% and 43%, respectively), probably because the organics from 4 ORG induced more changes than the 3 ORG treatment.

Even though most of the significant changes in metabolite levels were observed for metal exposure, the number of affected pathways did not necessarily reflect the same results. This means that many metabolites altered by metal exposure were likely of the same-related pathways when compared to the organic mixtures.

The MS-dial supported the identification of the metabolites evaluated by the ROIMCR procedure. It allowed us to identify more significantly changed metabolites in the positive mode, in a total of approximately 100 metabolites in the positive using the reference matched option, and around 50 for the negative mode. Similarly, the 1 MET presented higher levels of altered metabolites, except for the 4 ORG treatment which showed high levels of altered features. It is important to mention the differences in the approaches, while MS-DIAL revealed the identification of the metabolites according to the available information in the library databases, the ROIMCR procedure highlighted the most significant metabolites explaining the higher variance of the data. Therefore, both techniques can be used in a complementary way to maximize the identification of major metabolites altered under an experimental condition.

DISCUSSION

The results obtained in this study showed that exposure to environmental concentrations of complex mixtures of chemicals from Doce River did not elicit significant lethality in fish embryos, however, they were capable to trigger significant changes in metabolites levels. When comparing the isolated mixtures, the metals showed enhanced effects than the organics, probably due to their higher concentrations and bioavailability to the exposed individuals. However, their mixture seemed to have reduced the bioavailability of metals, since they showed reduced toxicity when combined. Thus, the mixture of metals with organic contaminants showed non-additive effect since their toxicity was lower than the estimated additivity of the components ((ATSDR, 2018)).

The two different mixtures of inorganics and organics showed a distinct pattern of toxicity, probably because the 6 MIX presented organics compounds (4 ORG) triggering higher changes in metabolites than the 5 MIX. The different patterns of toxicity observed in chemical mixtures containing both inorganic and organic may be related to the distinct chemical composition and solubility of organic chemicals between the two sites.

As observed in other studies approaching toxicity tests with contaminants from the Doce River, most of them reported non-lethality but sublethal effects in aquatic organisms, with less derived invertebrates showing higher sensitivity. This highlights again the importance of considering the investigation of sublethal endpoints for avoiding the underestimation of pollution from the Doce River, at environmentally relevant concentrations (Yamamoto et al., 2022). In this sense, metabolomics represented a powerful approach for detecting such subtle changes in a short-term exposure scenario.

The LC-HRMS technique allowed the detection of reduced levels of essential metabolites in all treatment groups, especially the amino acids. Amino acids have diverse important intracellular functions, in addition to their main recognized role as building blocks of proteins. Thus, their levels in biological samples may indicate alterations in their health status.

Although fewer features were upregulated after metal exposure, some may represent potential biomarkers, such as hypoxanthine for metal exposure from the 1MET group. This naturally occurring purine derivative is involved in the generation of superoxide anions in lysosomes, which may be related to mechanisms of metal incorporation and detoxification. Additionally, hypoxanthine and inosine accumulation may be related to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) defect and/or adenine phosphoribosyltransferase (APRT) enhanced activity, respectively, which may lead to increased levels of uric acid by xanthine oxidase activity (Hillyer et al., 2022).

It is well known that metal exposure may cause toxicity by oxidative stress mechanisms (Boelsterli, 2007; Ercal et al., 2001; Jomova & Valko, 2011a; Lushchak, 2011; Nuran Ercal et al., 2005). Redox-active metals, such as Fe, Cu, and Cr may increase the production of the highly reactive hydroxyl radical by Fenton reaction, while non-reactive-redox metals, such as As, Cd, and Pb may deplete glutathione (GSH) levels or inhibit other antioxidant pathways (Jomova & Valko, 2011b; Nuran Ercal et al., 2005; Sies, 1999). In either case, the disruption of redox homeostasis by accumulated oxidizing agents can damage organic biomolecules, such as lipids, proteins, and nucleic acids, altering their structures and functions. Excessive oxidation of lipids

alters the physical properties of cellular membranes, which can alter the ionic balance or even cause cell death, leading to tissue damage. This may occur once lipid peroxidation mechanisms involve the initial oxidation of a few lipid molecules resulting in self-propagating chain reactions (Yin et al., 2011).

In fact, wild fish from Doce River sampled closely to the mining companies, showed greater evidence of oxidative stress, such as lipid peroxidation in the liver and brain, when compared to other sites (submitted paper, Yamamoto et al. 2023 b). On the other hand, other sources of pollution introducing both organics and inorganics contaminants, such as domestic and industrial effluents, showed to be associated with distinct mechanisms of toxicity, e.g. DNA damage, genotoxicity, and GST activity alteration.

Although most ecotoxicological studies approach the assessment of single chemicals, aquatic organisms are typically exposed to a multitude of chemicals, being important to understand in which circumstances the toxicity of chemical mixtures could be predicted by the knowledge of individual components. Even though the complete identification of a chemical mixture composition could be provided, the estimation of the biological activity would be limited due to the insufficient information on the toxicity of single chemicals and their potential interactions. When considering the inherent complexity of the assessment of mixtures toxicity, relatively few studies have addressed their effects (Altenburger et al., 2004). Even less have explored the potential effects of inorganics and organics contaminants when combined. Linking exposure information to biological effects may clarify the identification of relevant contributors in complex mixtures.

The characterization of the effects of real-environmental mixtures has higher ecological relevance, however, brings new challenges related to the difficulties in obtaining more homogeneous samples representing a waste disposal site, and the lack of identification of all chemicals present in the mixture. The most likely final mode of action in multiple chemicals at environmentally realistic concentrations is concentration addition, whereas synergy is expected to occur in mixtures with a small number of components at high concentrations (Escher et al., 2020).

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) through the research grant Process 2020/14688-8. Additionally, the authors would like to thank for the kind support from the technicians of the Mass Spectrometry-Special Techniques Service (Roser Chaler Ferrer and Alexandre Garcia Barrera), as well as the staff of the different laboratories (Cell Toxicology Laboratory-UFPR, Environmental Chemistry Group-UFPR, Chemometrics' Group, IDAEA-CSIC). Finally, the authors also thank for the support from the staff of the Panama fish farm for the fish spawning procedures and fertilizations for obtaining fish embryos.

References

- Altenburger, R., Walter, H., & Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environmental Science and Technology*, 38(23), 6353–6362. <https://doi.org/10.1021/es049528k>
- ANA, A. N. de águas. (2015). *Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG*.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- ATSDR, A. for T. S. and D. R. (2018). *Framework for Assessing Health Impacts of Multiple Chemicals and Other Stressors*. <https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ipga.html>
- Backhaus, T., & Blanck, H. (2010). *Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art, Gaps and Options for Improvement*. Malin Carlgren.
- Bang, D. Y., Lim, S., & Moon, M. H. (2012). Effect of ionization modifiers on the simultaneous analysis of all classes of phospholipids by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion mode. *Journal of Chromatography. A*, 1240, 69–76. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.03.073>
- Bayat, M., Marín-García, M., Ghasemi, J. B., & Tauler, R. (2020). Application of the area correlation constraint in the MCR-ALS quantitative analysis of complex mixture samples. *Analytica Chimica Acta*, 1113, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.057>
- Boelsterli, U. A. (2007). *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets* (U. A. Boelsterli, Ed.; Second Edi). Taylor & Francis Inc, CRC Press.
- Bogomolov, A., & Hachey, M. (2007). Application of SIMPLISMA purity function for variable selection in multivariate regression analysis: A case study of protein secondary structure determination from infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 88(1), 132–142. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2006.07.006>
- Borba, R. P., Figueiredo, B. R., & Matschullat, J. (2003). Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. *Environmental Geology*, 44, 39–52. <https://doi.org/10.1007/s00254-003-0766-5>

- Bouhifd, M., Hartung, T., Hogberg, H. T., Kleensang, A., & Zhao, L. (2013). Review: Toxicometabolomics. In *Journal of Applied Toxicology* (Vol. 33, Issue 12, pp. 1365–1383). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/jat.2874>
- Castro, C., & Griffin, J. (2020). Lipids and NMR: more than mere acquaintances. *Nuclear Receptor Research*.
- Clish, C. B. (2015). Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies*, 1(1), a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>
- CPRM, S. G. do B. (2015). *Monitoramento Especial da bacia do Rio Doce: Relatório 02 Geoquímica*.
- de Juan, A., Jaumot, J., & Tauler, R. (2014). Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Analytical Methods*, 6(14), 4964–4976. <https://doi.org/10.1039/c4ay00571f>
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2010). Omics Technology. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, 11–31. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_2
- Dettmer, K., & Hammock, B. D. (2004). Metabolomics - A new exciting field within the “omics” sciences. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 112, Issue 7). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1289/ehp.112-1241997>
- Dey, A. S., Ayon, N. J., Bhattacharya, C., Gutheil, W. G., & Mukherji, M. (2020). Positive/negative ion-switching-based LC–MS/MS method for quantification of cytosine derivatives produced by the TET-family 5-methylcytosine dioxygenases. *Biology Methods and Protocols*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/BIOMETHODS/BPAA019>
- Dias, C. A., Costa, A. S. V. da, Guedes, G. R., Umbelino, G. J. de M., Sousa, L. G. de, Alves, J. H., & Silva, T. G. M. (2018). Impactos do rompimento da barragem de Mariana na qualidade da água do rio Doce. *Revista Espinhaço | UFVJM*, 7(1), 21–35.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic Metals inducing oxidative stress.pdf. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 529–539.
- Escher, B. I., Stapleton, H. M., & Schymanski, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367(6476), 388–392. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAY6636>
- Fernandes, G. W., Goulart, F. F., Ranieri, B. D., Coelho, M. S., Dales, K., Boesche, N., Bustamante, M., Carvalho, F. A., Carvalho, D. C., Dirzo, R., Fernandes, S., Galetti, P. M., Millan, V. E. G., Mielke, C., Ramirez, J. L., Neves, A., Rogass, C., Ribeiro, S. P., Scariot, A., & Soares-Filho, B. (2016). Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza e Conservacao*, 14(2), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2016.10.003>
- Gauthier, P. T., Norwood, W. P., Prepas, E. E., & Pyle, G. G. (2014). Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic Toxicology*, 154, 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.026>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., & Tauler, R. (2019). ROIMCR: A powerful analysis strategy for LC-MS metabolomic datasets. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-2848-8/FIGURES/6>
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusis, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* 2017 18:1, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1215-1>
- Hatje, V., Pedreira, R. M. A., De Rezende, C. E., Schettini, C. A. F., De Souza, G. C., Marin, D. C., & Hackspacher, P. C. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing

- dam failures worldwide. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>
- Hillyer, K. E., Raes, E., Karsh, K., Holmes, B., Bissett, A., & Beale, D. J. (2022). Metabolomics as a tool for in situ study of chronic metal exposure in estuarine invertebrates. *Environmental Pollution*, 292, 118408. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118408>
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M. Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., ... Nishioka, T. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry* : *JMS*, 45(7), 703–714. <https://doi.org/10.1002/JMS.1777>
- IBAMA, I. B. do M. A. e dos R. N. R. (2015). *Laudo Técnico Preliminar - Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais*.
- Jacobsen, P. R., Axelstad, M., Boberg, J., Isling, L. K., Christiansen, S., Mandrup, K. R., Berthelsen, L. O., Vinggaard, A. M., & Hass, U. (2012). Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 237–250. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.099>
- Jarvis, I. W. H., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., & Stenius, U. (2014). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*, 321, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.012>
- Jaumot, J., de Juan, A., & Tauler, R. (2015). MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 140, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011a). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011b). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Koelmel, J. P., Napolitano, M. P., Ulmer, C. Z., Vasiliou, V., Garrett, T. J., Yost, R. A., Prasad, M. N. V., Godri Pollitt, K. J., & Bowden, J. A. (2020a). Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. *Metabolomics*, 16(5), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01665-3>
- Koelmel, J. P., Napolitano, M. P., Ulmer, C. Z., Vasiliou, V., Garrett, T. J., Yost, R. A., Prasad, M. N. V., Godri Pollitt, K. J., & Bowden, J. A. (2020b). Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. In *Metabolomics* (Vol. 16, Issue 5, pp. 1–22). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01665-3>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Ogiwara, A., Meissen, J., Showalter, M., Takeuchi, K., Kind, T., Beal, P., Arita, M., & Fiehn, O. (2017). Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods* 2017 15:1, 15(1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Liigand, P., Kaupmees, K., Haav, K., Liigand, J., Leito, I., Girod, M., Antoine, R., & Kruve, A. (2017). Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. *Analytical Chemistry*, 89(11), 5665–5668. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B00096>/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-000969_0003.JPEG
- Lima, A. da C. (2008). *Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em águas superficiais nos Rios Piracicaba e Doce, Ipatinga - MG, utilizando a técnica de EFS - CLAE - DAD*. Universidade Federal de Ouro Preto.

- Liu, Z., Tu, M. J., Zhang, C., Jilek, J. L., Zhang, Q. Y., & Yu, A. M. (2019). A reliable LC-MS/MS method for the quantification of natural amino acids in mouse plasma: Method validation and application to a study on amino acid dynamics during hepatocellular carcinoma progression. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1124, 72. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.05.039>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lynn, K. S., Cheng, M. L., Chen, Y. R., Hsu, C., Chen, A., Lih, T. M., Chang, H. Y., Huang, C. J., Shiao, M. S., Pan, W. H., Sung, T. Y., & Hsu, W. L. (2015). Metabolite identification for mass spectrometry-based metabolomics using multiple types of correlated ion information. *Analytical Chemistry*, 87(4), 2143–2151. <https://doi.org/10.1021/ac503325c>
- Mak, J., Cowan, T. M., & Le, A. (2019). Quantitative Analysis of Underivatized Amino Acids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2030, 85–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1_8
- Março, P. H., Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., & Tauler, R. (2014). Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: Descrição, funcionamento e aplicações. In *Química Nova* (Vol. 37, Issue 9, pp. 1525–1532). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140205>
- Martín-Blázquez, A., Díaz, C., González-Flores, E., Franco-Rivas, D., Jiménez-Luna, C., Melguizo, C., Prados, J., Genilloud, O., Vicente, F., Caba, O., & Pérez del Palacio, J. (2019). Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55952-8>
- Matthias Peter Roeser, H., & Angelika Roeser, P. (2010). O QUADRILÁTERO FERRÍFERO - MG, BRASIL: ASPECTOS SOBRE SUA HISTÓRIA, SEUS RECURSOS MINERAIS E PROBLEMAS AMBIENTAIS RELACIONADOS. *GEONOMOS*, 18(1), 33–37.
- Melvin, S. D., Lanctôt, C. M., Doriean, N. J. C., Carroll, A. R., & Bennett, W. W. (2018). Untargeted NMR-based metabolomics for field-scale monitoring: Temporal reproducibility and biomarker discovery in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a metal(loid)-contaminated wetland. *Environmental Pollution*, 243, 1096–1105. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.071>
- Mor, N. C., Correia, B. S. B., Val, A. L., & Tasic, L. (2020). A protocol for fish lipid analysis using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(4), 662–672. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190230>
- Nardecchia, A., & Duponchel, L. (2020). Randomised SIMPLISMA: Using a dictionary of initial estimates for spectral unmixing in the framework of chemical imaging. *Talanta*, 217, 121024. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121024>
- Nuran Ercal, B. S. P., Hande Gurer-Orhan, B. S. P., & Nukhet Aykin-Burns, B. S. P. (2005). Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Me-tal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529–539. <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>
- Ortiz-Villanueva, E., Benavente, F., Piña, B., Sanz-Nebot, V., Tauler, R., & Jaumot, J. (2017). Knowledge integration strategies for untargeted metabolomics based on MCR-ALS analysis of CE-MS and LC-MS data. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 978). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.049>
- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018a). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 635, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>

- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018b). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 635, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>
- Ortiz-Villanueva, E., Navarro-Martín, L., Jaumot, J., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Piña, B., & Tauler, R. (2017). Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach. *Environmental Pollution*, 231, 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.095>
- Pérez-Cova, M., Bedia, C., Stoll, D. R., Tauler, R., & Jaumot, J. (2021). MSroi: A pre-processing tool for mass spectrometry-based studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 215(April). <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104333>
- Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J. P., Morla, A., & Bouchu, D. (2003). ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 17(12), 1297–1311. <https://doi.org/10.1002/RCM.1054>
- Quadra, G. R., Roland, F., Barros, N., Malm, O., Lino, A. S., Azevedo, G. M., Thomaz, J. R., Andrade-Vieira, L. F., Praça-Fontes, M. M., Almeida, R. M., Mendonça, R. F., Cardoso, S. J., Guida, Y. S., & Campos, J. M. S. (2019). Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. *Chemosphere*, 215, 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.104>
- Rivera, R., & Garrido, N. (2018). Metabolomics. In *Oxidants, Antioxidants, and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 277–285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00025-0>
- Rochat, B., Mohamed, R., & Sottas, P. E. (2018). LC-HRMS metabolomics for untargeted diagnostic screening in clinical laboratories: A feasibility study. *Metabolites*, 8(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/metabo8020039>
- Rodrigues, A. S. de L., Malafaia, G., Costa, A. T., & Nalini Júnior, H. A. (2014). Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte River basin, Minas Gerais State, Brazil. *Environmental Earth Sciences*, 71(9), 4177–4186. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2808-y>
- Rotchell, J. M., & Ostrander, G. K. (2003). Molecular Markers of Endocrine Disruption in Aquatic Organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6(March 2012), 453–495. <https://doi.org/10.1080/10937400390223430>
- Sales, N. G., Mariani, S., Salvador, G. N., Pessali, T. C., & Carvalho, D. C. (2018). Hidden Diversity Hampers Conservation Efforts in a Highly Impacted Neotropical River System. *Frontiers in Genetics*, 9(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00271>
- Salihovic, S., Broeckling, C. D., Ganna, A., Prenni, J. E., Sundström, J., Berne, C., Lind, L., Ingelsson, E., Fall, T., Ärnlov, J., & Nowak, C. (2020). Non-targeted urine metabolomics and associations with prevalent and incident type 2 diabetes. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72456-y>
- Scholz, S., & Mayer, I. (2008). Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293(1–2), 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.008>
- Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F. F., & Batista, B. L. (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>

- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27(99), 916–921.
- Tada, I., Tsugawa, H., Meister, I., Zhang, P., Shu, R., Katsumi, R., Wheelock, C. E., Arita, M., & Chaleckis, R. (2019). Creating a reliable mass spectral–retention time library for all ion fragmentation-based metabolomics. *Metabolites*, 9(11).
<https://doi.org/10.3390/metabo9110251>
- Tauler, R. (2021). Multivariate curve resolution of multiway data using the multilinearity constraint. *Journal of Chemometrics*, 35(2), 1–24. <https://doi.org/10.1002/cem.3279>
- Tauler, R., Gorrochategui, E., Jaumot, J., & Tauler, R. (2015). A protocol for LC-MS metabolomic data processing using chemometric tools. *Protocol Exchange*, 1–28.
<https://doi.org/10.1038/protex.2015.102>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., Vanderghenst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods* 2015 12:6, 12(6), 523–526.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Tsugawa, H., Ikeda, K., Takahashi, M., Satoh, A., Mori, Y., Uchino, H., Okahashi, N., Yamada, Y., Tada, I., Bonini, P., Higashi, Y., Okazaki, Y., Zhou, Z., Zhu, Z. J., Koelmel, J., Cajka, T., Fiehn, O., Saito, K., Arita, M., & Arita, M. (2020). A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nature Biotechnology* 2020 38:10, 38(10), 1159–1163. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2>
- Verhoeven, A., Giera, M., & Mayboroda, O. A. (2020). Scientific workflow managers in metabolomics: an overview. *Analyst*, 145(11), 3801–3808.
<https://doi.org/10.1039/D0AN00272K>
- Violi, J. P., Bishop, D. P., Padula, M. P., Steele, J. R., & Rodgers, K. J. (2020). Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 131, 116018.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.116018>
- WATERS. (2009, August). *Gradient Separation of Amino Acids on ACQUITY UPLC BEH HILIC | Waters*. Application Note WA60134.
<https://www.waters.com/nextgen/en/library/application-notes/2009/gradient-separation-of-amino-acids-on-acquity-uplc-beh-hilic.html>
- Watson, A. D. (2006). Thematic review series: Systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 47(10), 2101–2111.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R600022-JLR200>
- Weber, A. A., Sales, C. F., de Souza Faria, F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2020). Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Xiao, J. F., Zhou, B., & Ransom, H. W. (2012). Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry : TRAC*, 32, 1.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.08.009>
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Kim, B. S. M., Carvalho, M. U., Figueira, R. C. L., Cavalcante, R. M., Grassi, M. T., & Abessa, D. M. S. (2022). Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River four years after the mining dam collapse disaster. *Data in Brief*, 45, 108715.
<https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108715>
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. F. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Figueira, R. C. L., Cavalcante, R. M., Grassi, M. T., & Abessa, D. M. S. (2023). Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of

- contamination and a major environmental disaster. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 9, 100250. <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2023.100250>
- Yamamoto, F. Y., Souza, A. T. C., Paula, V. de C. S. de, Beverari, I., Garcia, J. R. E., Padial, A. A., & de Souza Abessa, D. M. (2022). From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Science of the Total Environment*, 846(July), 157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>
- Yang, Z., Anacleto, J., & Maljers, L. (2014). Positive-Negative Switching LC–MS–MS for Quantification of Pesticides in Juice. *Column*, 10(18), 9428–9435. <https://doi.org/10.1021/JF503468T>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>

Table 1. Treatment effects in metabolites levels analyzed by multivariate analysis. Statistical significance between treatment groups analyzed by ASCA showing the p value and effect of one factor analysis (treatment vs. control). The ROIMCR results show the number of significant changes in metabolites levels from their 100 resolved components, for each acquisition mode (positive and negative).

	1 MET		2 MET		3 ORG		4 ORG		5 MIX		6 MIX	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
ASCA 1000 perm. (p value/effect)	0,001/ 64.8	0,001/ 54.1	0,001/ 53.4	0,001/ 41.9	0,001/ 44.26	0,015/ 30.6	0,001/ 44.9	0,001/ 36.9	0,009/ 33.1	0,001/ 34.9	0,001/ 45.5	0,001/ 54.9
ROIMCR RESULTS												
Significant DOWN	54	50	59	40	46	23	44	26	33	23	37	50
Significant UP	3	6	2	4	2	1	3	4	1	2	3	5
Signif. (%)	66%	67%	70%	52%	52%	27%	53%	35%	37%	26%	43%	65%
Total sign Pos/Neg	104 (52%)		99 (49%)		69 (34%)		70 (35%)		56 (28%)		87 (43%)	

Table 2. Most significant affected pathways of metabolites levels for each treatment compared to its respective control group, analyzed by the Metaboanalyst software.

ROIMCR	1 MET		2 MET		3 ORG		4 ORG		5 MIX		6 MIX	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X
Arginine biosynthesis		X	X	X				X	X			X
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	X	X		X			X	X		X		
Histidine metabolism		X						X				X
beta-Alanine metabolism								X				X
Arginine and proline metabolism					X		X		X		X	
Phenylalanine metabolism							X			X		
Lysine degradation	X		X								X	
Alanine, aspartate and glutamate metabolism		X		X				X	X	X		X
Nicotinate and nicotinamide metabolism												
Glycerophospholipid metabolism												
Butanoate metabolism		X		X					X			X
Pantothenate and CoA biosynthesis		X										X
Glycine, serine and threonine metabolism				X	X	X		X			X	
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	X	X		X		X		X		X		X
Glutathione metabolism												X
Purine metabolism											X	
Taurine and hypotaurine metabolism		X		X		X	X		X	X		
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism		X		X				X				X
Valine, leucine and isoleucine degradation				X			X					
Nitrogen metabolism		X						X	X			X
D-Glutamine and D-glutamate metabolism		X						X	X	X		X
Sphingolipid metabolism												
Glycerophospholipid metabolism			X		X						X	
Cysteine and methionine metabolism					X							
Citrate cycle (TCA cycle)												X
	23		13		12		7		15		11	
											18	

Figure 1. Treatment groups of inorganic and organic chemicals mixtures represented different sources of pollution from the Doce River.

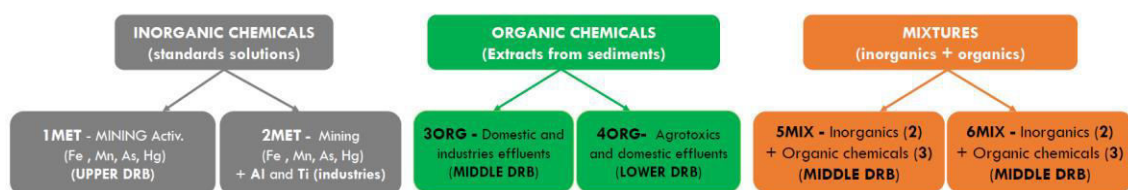


Figure 2. Workflow of the LC-HRMS-based metabolomics approach combined with ROIMCR for data analysis in the identification of main altered metabolites in fish embryo samples after exposure to different mixtures of inorganic and organic contaminants (isolated and combined). Different multivariate analyses were applied to observe the differences in the patterns of regulation of the metabolites under distinct conditions of chemical exposure.

FISH EMBRYO TOXICITY TEST

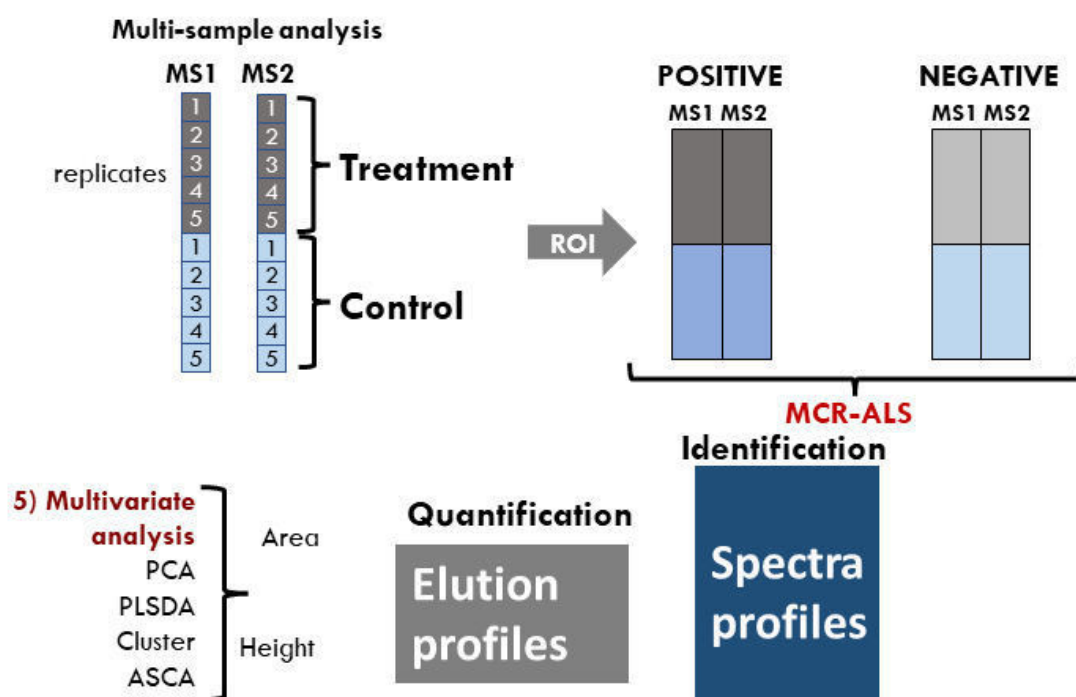
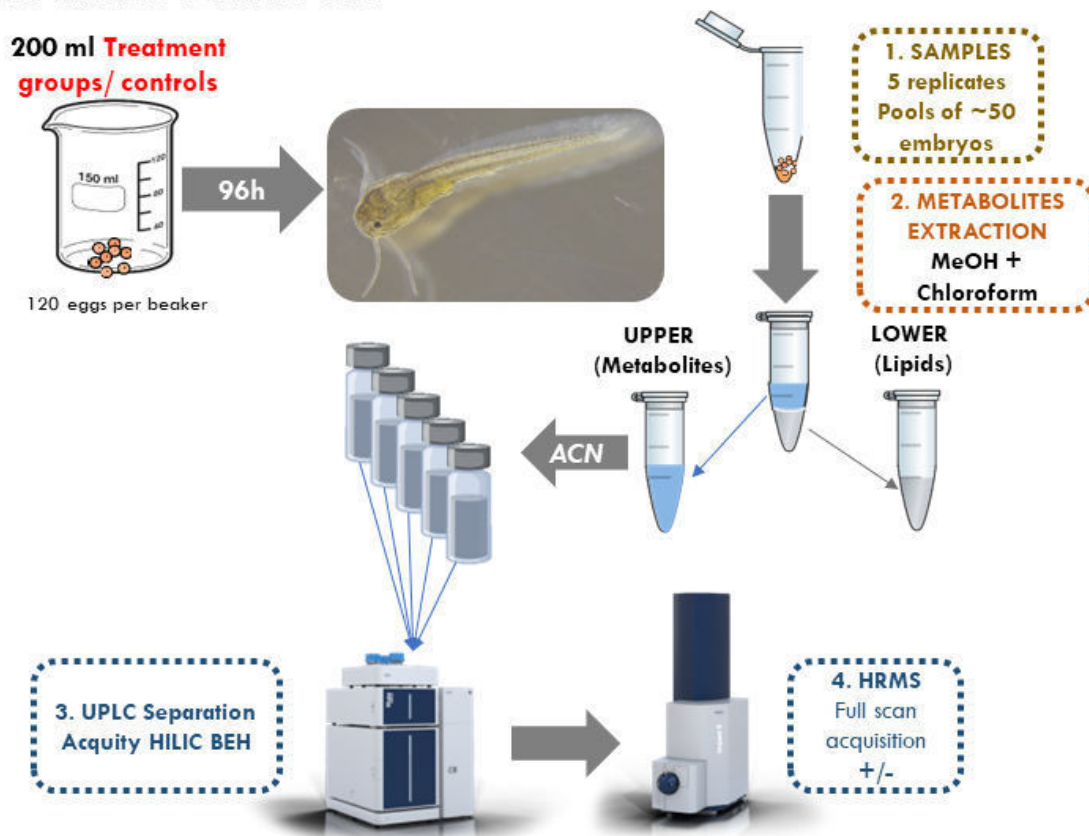


Figure 3. PCA analysis of the height values of the main components resolved by the ROIMCR technique comparing the scores obtained for the treatment replicates versus the control replicates.

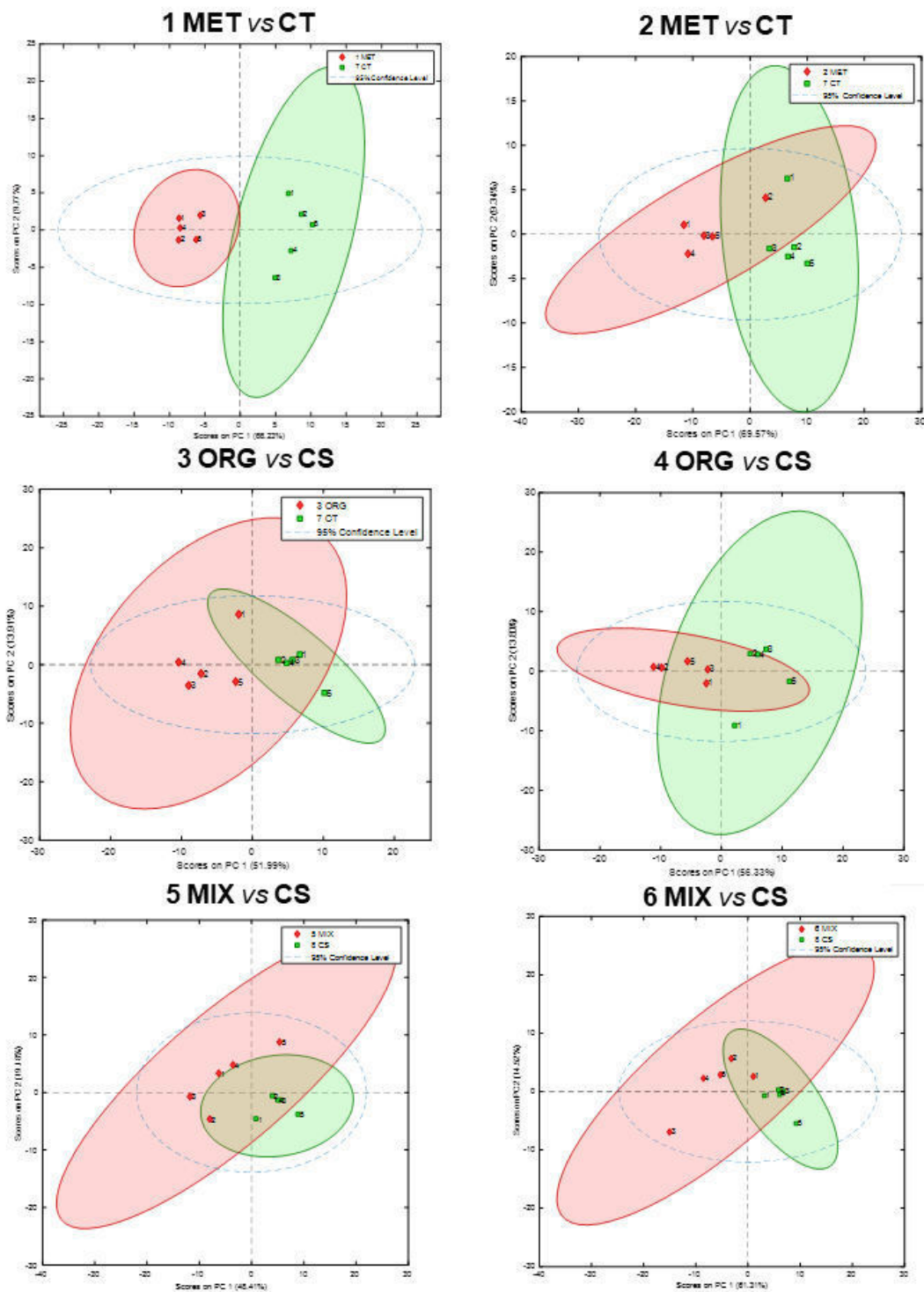


Figure 4. Loading values obtained by PCA analysis of the height values of the 100 components resolved by the ROIMCR technique comparing the for the treatment replicates versus the control replicates.

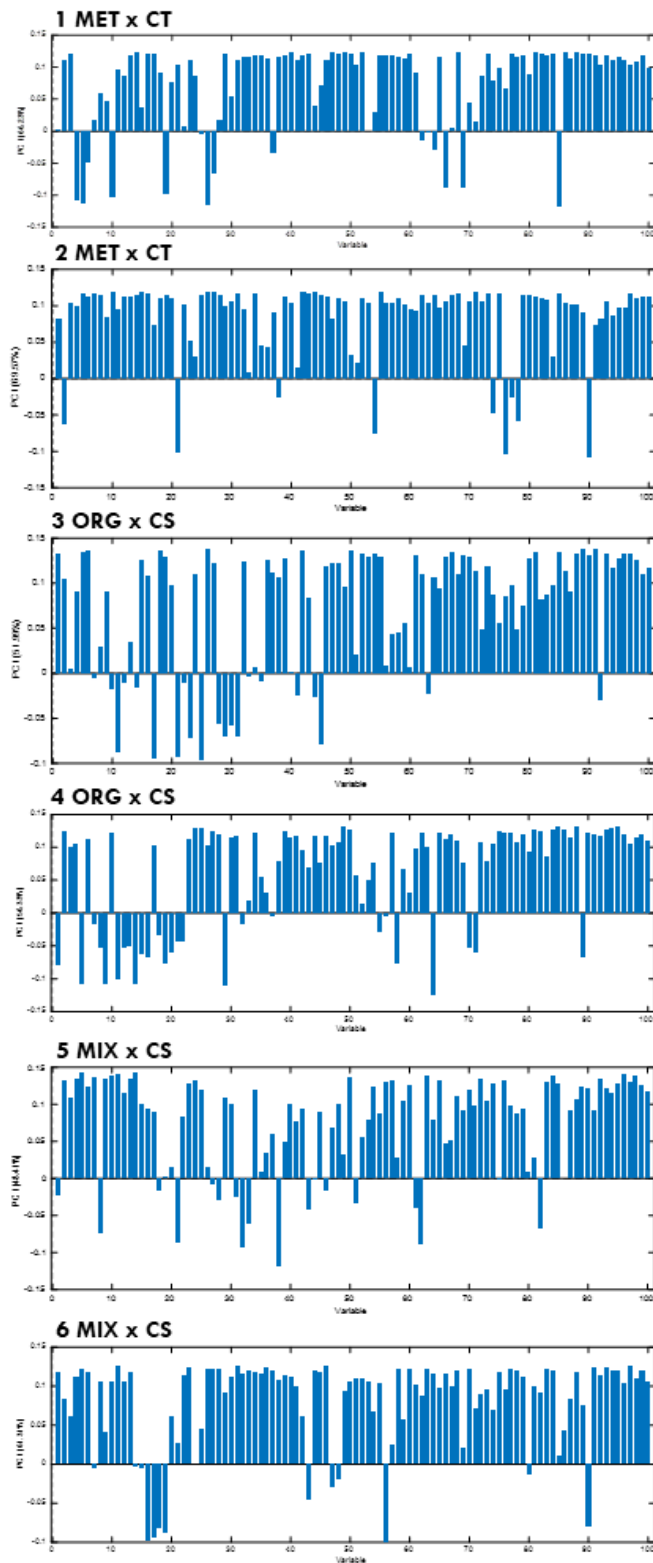


Figure 5. Clustergram of the major metabolites upregulated (red) and downregulated (blue) for each replicate of control group and the 1 MET treatment group.

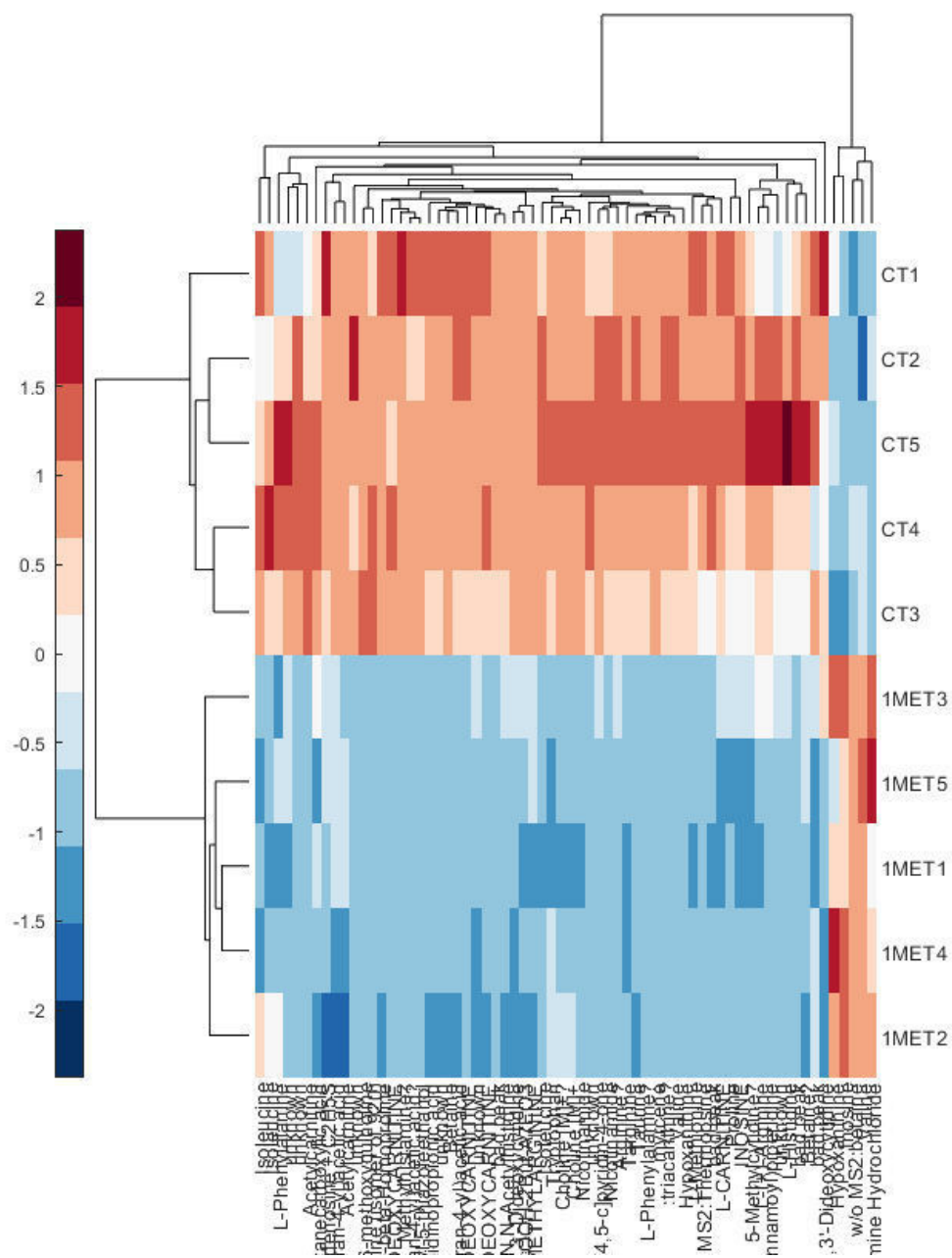


Figure 6. Graphical illustrations of the elution and spectra profiles of four different metabolites detected in the fish embryo samples, obtained by the ROIMCR approach, with data analysis of MS and MS/MS DIA in positive acquisition mode. Upper left, ROIMCR elution profiles of the metabolites vs scan number (upper) and vs retention time (lower). Lower left, the profile area and maximum height of the component for each sample replicate. Upper right more significant m/z in MS1 and MS2 signals. Lower right MS1(+), MS2(+) ROIMCR resolved spectra profiles with the m/z values of their more intense signals.

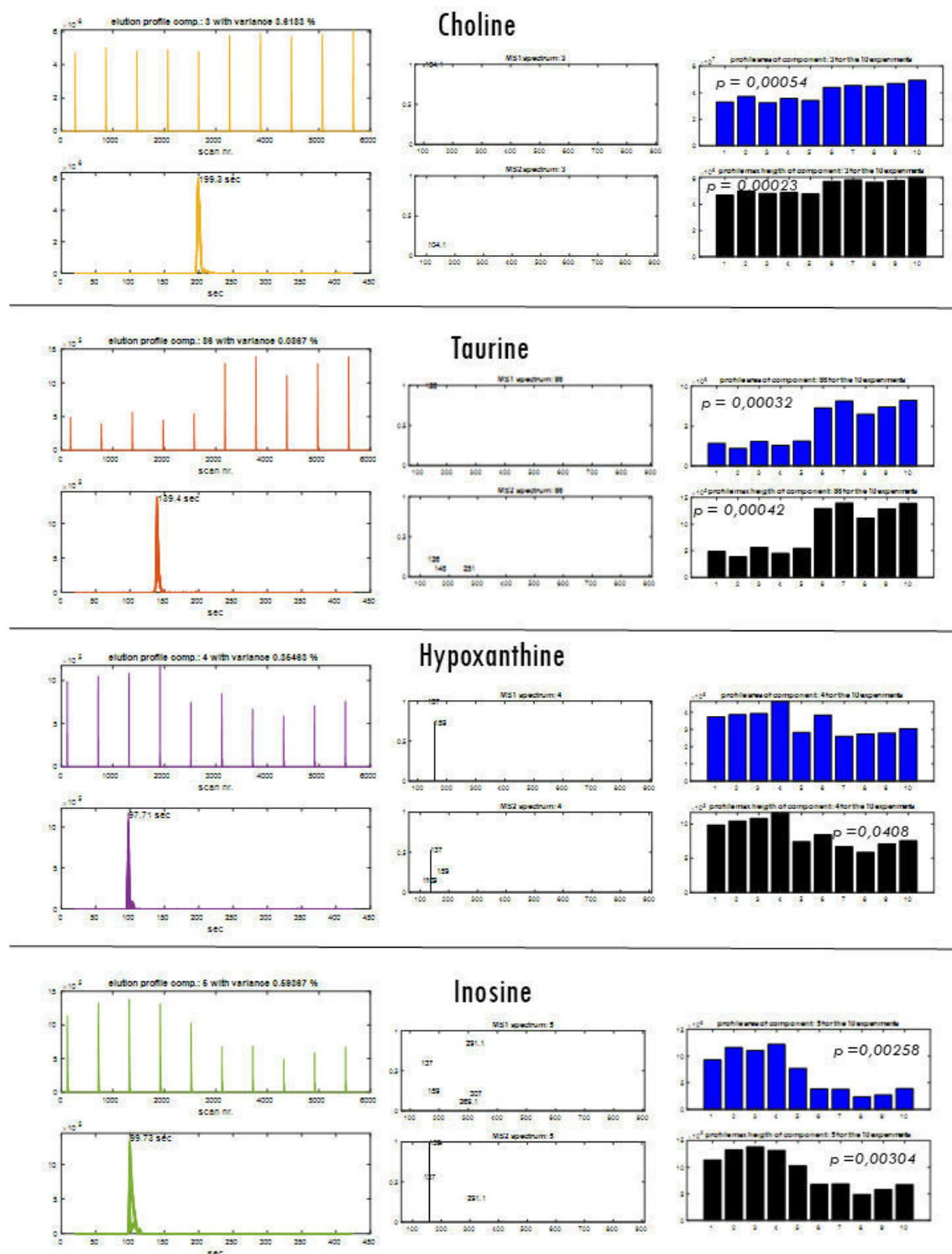
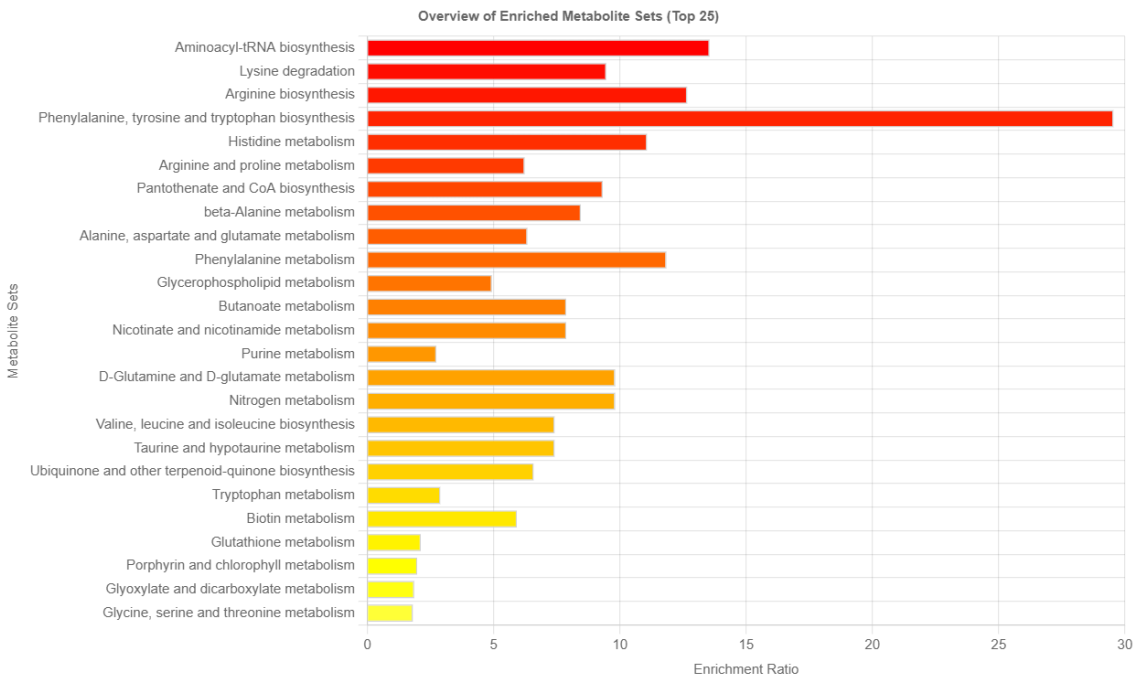


Figure 7. Main metabolic pathways affected in fish embryos by the exposure to the 1 MET treatment group when compared to the control group. The name of the pathways were obtained in the METABOANALYST software.



Simultaneous detection and identification of multiple metabolites standards as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics

Flávia Yoshie Yamamoto^{ab} & Ana López Antia^a, Bernat Oró-Nolla^a, Silvia Lacorte^a, Denis Moledo de Souza Abessa^b, Romà Tauler^a

^a - Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Barcelona, Spain

^b - Institute of Biosciences, São Paulo State University, São Vicente, Brazil.

Different mixtures of metabolites were selected to be used as powerful biomarkers in targeted and untargeted metabolomics. Six different mixtures were prepared to contain metabolites of amino acids (1), nucleosides (2), organic acids (3), other polar metabolites (4), lipidic hormones and other hydrophobic metabolites (5), and a mixture of surrogates and internal standards. Additionally, a big mix mixture was performed containing a total of 95 compounds (full list is given at the end of the document) with the combination of all the 6 mixtures, diluted at different concentrations for obtaining a standard curve for their quantification in the targeted approach.

Preliminar Results

Table 1. Detection and Identification of the metabolites standards in each standard mixture by three different approaches, the Data analysis software, the MS-DIAL software and the ROIMCR approach.

	POSITIVE Acq.			NEGATIVE Acq.			TOTAL (+/-)
	Data Analysis	MS-DIAL	ROIMCR*	Data Analysis	MS-DIAL	ROIMCR*	
MIX 1 (17)							
Aminoacids	15	15	15	13	13	15	17 (100%)
MIX 2 (12)							
Nucleosides	8	9	8	9	10	5	11 (91.6%)
MIX 3 (17)							
Organic acids	3	4	4	9	8	7	11 (64.7%)
MIX 4 (29)							
Individual comp.	13	11	15	16	12	6	22 (75.8%)
MIX 5 (17)							
Hormones	5	7	6	8	7	4	11 (64.7%)
MIX 6 (6)							
Surrogates	2	3	3	2	2	2	3 (50.0%)
TOTAL (95)	46 (48.4%)	49 (51.5%)	48 (50.5%)	57 (60%)	52 (54.7%)	35(36.8%)	75 (78.9%)

*Need to confirm the results

METABOLOMICS PROTOCOL

(Ortiz-Villanueva et al., 2018) – Zebrafish embryos

1 – METABOLITES EXTRACTION

- **Samples:** pool of approximately 50 lyophilized embryos of 96h (*dry weight of 50 mg*)

1. Thaw samples in ice.
2. Include a Blank extraction sample (empty microtube).
3. Add 900 μL of ice-cold methanol (HPLC grade) + 10 μL of surrogates mix (methionine sulfone, lipid mixture) at 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.
4. Vortex for 15 s; homogenize with tissue lyzer for 4 min (40Hz); vortex for 15 s.
5. Add 500 μL of water and 400 μL of chloroform into the supernatant.
6. Vortex for 15 s, sonicate for 10 min and place on ice for 10 min.
7. Centrifuge at 20,000 g for 10 min at 4° C.
8. Separate the aqueous fraction (upper phase) in another microtube and evaporate under nitrogen gas for METABOLOMICS analysis.
9. Save the lower phase for LIPIDOMICS and evaporate under nitrogen gas.
10. Reconstitute the with 350 μL of 1:1 acetonitrile:water (v/v) for METABOLOMICS or 100% Methanol for LIPIDOMICS, and add 10 μL of PIPES (IS) at 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ in each.
11. Centrifuge at 20,000 g for 5 min and store in vials at -80° C.
12. Prepare a Reference sample (QCs) pooling 10 μL of each sample.
13. Prepare Internal standard as aqueous solution of 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (1 ppm) and store aliquots at -20° C.

2 – CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS IN LC-HRMS

- UHPLC system (BRUKER)
- Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) column (**ACQUITY UPLC BEH** column, 100 mm length, 2.1 mm diameter, 1.7 μm particle size)
- *Prepare Mobile phases at the same day or one day before preferably (store organic phase at 4° C)*

<i>Salty solutions</i>	Mobile Phase A1 (Aqueous phase)	Mobile Phase B1 (Organic phase)
For 1 L of solution	50:50 (ACN/Water) 10 mM ammonium formate (NH_4COOH) + 0.2% HCOOH	90:10 (ACN/Water) 10 mM ammonium formate (NH_4COOH) + 0.2% HCOOH
Water	500 ml	100 ml
ACN	500 ml	900 ml
10 mM NH_4COOH	0.315 g	0.315 g
0.2% HCOOH	2 ml	2 ml
<i>Pure solutions</i>	Mobile Phase A2 Pure Water	Mobile Phase B2 * 50:50 (pure ACN/Water)

- Use ultrapure reagents (HPLC grade, Fisher brand) and appropriate washing of glassware

* When B1 has salt the B2 needs water (can not be pure solvent)

UHPLC Conditions:

1. Degass solvents for 15 min by sonication before use
2. Connect right cables of the mobile phases (**A** for Aqueous phase/**B** for Organic phase in Bruker equipment)
3. If necessary (previous had used other salts) clean channels A1, B1 with 100% of water and after organic phase (PURGE), before connecting the column
4. Run Flow Injection Analysis (FIA) to optimize MS parameters, if necessary
5. Connect the column (check arrows above), green cable to discharge
6. Conditionate the column with pure solutions for first (A2, B2)
7. Increase flow rate slowly (each 0.05 ml.min⁻¹), observing stability of the pressure
8. When reaching the right flow rate, change for mobile phases containing salt at same conditions of the initial elution gradient

<i>Start with pure solutions</i>	Mobile Phase A2 (Aqueous phase)	Mobile Phase B2 (Organic phase)
Start Flow 0.025 ml. min	0%	100%
Flow 0.05 to 0.3 ml. min *	0%	100%
Flow 0.3 ml. min	10%	90%
<i>Change to salty solutions</i>	Mobile Phase A1	Mobile Phase B1
Flow 0.3 to 0.4 ml. min	10%	90%

**Before increasing the flux (each 0.025 ml.min when the column is new, can be 0.05 when it is used), observe the pressure and wait until it is stabilized (about 5 min)*

Set parameters of Chromatography

- Elute PUMP -> Direct Control
- T autosampler: 10°C.
- Injection volume: 2-10 µL (start trying the lowest volume).
- T column: 50°C.
- Flux: 0.4 mL/min.
- Needle height: 2.0 mm (lower volume, without insert) / 4.0 mm with insert
- Gradient:

Time (min)	% A1	% B1
0	0.1	99.9
4	25	75
6	50	50
7	90	10
8	0.1	99.9
10	0.1	99.9

-Include the sequence of samples to be injected (name, volume of injection, data path to be recorded) and include the Chromatography method

Sequence of samples to be injected in the QTOF:

1	Blank (Pure ACN)
2	Blank (50:50 ACN:Water)
3	Mix of standards (1-5)
4	Big Mix
5	Big mix standard curve (0.2-1.8 ppm)
6	Blank (50:50 ACN:Water)
7	Repeat 5x big mix at 1 ppm
8	Blank (50:50 ACN:Water)
9	Blank of extraction (1)
10	QCs 5x (pool of samples)
11	Samples (1-60)*

* preferably in random position

- Include the MS method
- Check temperature and pressure, verify if the right column is selected (1, 2...)

BRUKER IMPACT II QTOF Conditions

Full scan mass range was from m/z 60 to 1000

	Positive	Negative
End Plate	500V	
Capillary	2500 V	2500 V
Nebulizer	2.0 Bar	2.0 Bar
Dry Gas	8.0 L.min ⁻¹	
Dry Temperature	200° C	
AIF: normalized collision energy (NCE)	25 eV	30 eV
Ion energy	4 eV	6 eV
Prepulse storage	6 µs	4 µs

Metabolites identification LQ-TOF-MS (Flavia y Ana; June 2022)

MIX	Concentrations	Solvent
Mix 1_Aminoacids. mix	~ 2 ppm	Water:ACN
Mix 2_Nucleosides mix	~ 2 ppm	Water:ACN
Mix3_26 mix (organic acids+others)	~ 2 ppm	Water:ACN
Mix4_Individual compounds	2 ppm	Water:ACN
Mix5_Mix lipids	2 ppm	Water:MeOH
Mix 6 – SURROGATES	2 ppm	Water:MeOH
BIG MIX	~ 1.8 to 0.2 ppm	Water:MeOH

References

Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 635, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>

LIPIDOMICS

CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS IN LC-HRMS

- UHPLC system (Waters)
- Kinetex C8 100Å 1.7µm, 2.1x100mm
- *Prepare Mobile phases at the same day or one day before preferably*

<i>Salty solutions</i>	Mobile Phase A1 (Acqueous phase)	Mobile Phase B1 (Organic phase)
For 1 L of solution	Water 2 mM ammonium formate (NH ₄ COOH) + 0.2% HCOOH	Methanol 1 mM ammonium formate (NH ₄ COOH) + 0.2% HCOOH
Water	1000 ml	-
MeOH	-	1000 ml
NH ₄ COOH	126.12 mg	63.06 mg
0.2% HCOOH	2 ml	2 ml
<i>Pure solutions</i>	Mobile Phase A2	Mobile Phase B2 *
	(Pure Water)	50:50 (MeOH/Water)

- Use ultrapure reagents (HPLC grade, Fisher brand) and appropriate washing of glassware

* When B1 has salt the B2 can not be pure solvent

UHPLC Conditions:

- Degass solvents for 15 min by sonication before use
- Connect right cables of the mobile phases (**A** for Acqueous phase/**B** for **Organic** phase in Bruker equipment)
- If necessary (previous had used other salts) clean channels A1, B1 with 100% of water and after organic phase (PURGE), before connecting the column
- Connect the column (check arrows above), green cable to discharge
- Conditionate the column with pure solutions for first (A2, B2)
-

<i>Start with pure solutions</i>	Mobile Phase A2 (Acqueous phase)	Mobile Phase B2 (Organic phase)
Start	0%	100%
Flow 0.025 ml. min		
Flow 0.05 to 0.3 ml. min *	0%	100%
Flow 0.3 ml. min	20%	80%
<i>Change to salty solutions</i>	Mobile Phase A1	Mobile Phase B1
Flow 0.3 ml. min	20%	80%

*Before increasing the flux (each 0.025 ml.min when the column is new, can be 0.05 when it is used), observe the pressure and wait until it stabilize

Set parameters

- T autosampler: 10°C.
- Injection volume: 1-10 µL (start trying the lowest volume).
- T column: 30°C.
- Flux: 0.3 mL/min.
- Needle height: 2.0 mm (lower volume, without insert)
- Gradient:

Time (min)	% A	% B
0	20.0	80.0
3	10	90.0
6	10	90.0
15	1.0	99.0
18	1.0	99.0
20	20.0	80.0

- Include the MS method
- Check temperature and pressure, verify if the right column is selected (1, 2...)

BRUKER IMPACT II QTOF Conditions

Full scan mass range was from m/z 60 to 1000

	Positive	Negative
End Plate	500V	500V
Capillary	2500 V	2500 V
Nebulizer	2.0 Bar	2.0 Bar
Dry Gas	8.0 L.min ⁻¹	11 L.min ⁻¹
Dry Temperature	200° C	300° C
Collision Energy (bbCID)	25 eV	30 eV
Collision Energy (MS)	4 eV	6 eV
Prepulse storage	6 µs	4 µs

Table 1. List of compounds analyzed in this study

MIX 1	Sigma sol (mM)	MIX 1 (ppm)	BIG MIX (6x diluted)	Std curve 2	Std curve 3	Std curve 4	Std curve 5	Formula	Exact Mass	[H+]	[H-]	[NH4+]	[Na+]	[Hac-H]
1 L-Alanine	89,09	6,682	1,114	0,835	0,557	0,278	0,139	C3H7NO2	89,04768	90,05551	88,03985	107,0821	112,0374	148,061
2 Ammonium chloride	53,491	4,012	0,669	0,501	0,334	0,167	0,084	NH4Cl	53,00323	54,01105	51,9954	71,0376	75,993	112,0165
3 L-(+)-Arginine	174,2	13,065	2,178	1,633	1,089	0,544	0,272	C6H14N4O2	174,1117	175,1195	173,1039	192,1461	197,1014	233,125
4 L-Aspartic acid	133,1	9,983	1,664	1,248	0,832	0,416	0,208	C4H7NO4	133,0375	134,0453	132,0297	151,0719	156,0273	192,0508
5 L-Cystine	240,3	9,011	1,502	1,126	0,751	0,375	0,188	C6H12N2O4S2	240,0238	241,0316	239,016	258,0582	263,0136	299,0371
6 L-Glutamic acid	147,13	11,035	1,839	1,379	0,92	0,46	0,23	C5H9NO4	147,0532	148,061	146,0453	165,0875	170,0429	206,0665
7 Glycine	75,07	5,63	0,938	0,704	0,469	0,235	0,117	C2H5NO2	75,03203	76,03986	74,0242	93,0664	98,0218	134,0453
8 L-Histidine	155,15	11,636	1,939	1,455	0,97	0,485	0,242	C6H9N3O2	155,0695	156,0773	154,0616	173,1038	178,0592	214,0828
9 L-Isoleucine	131,17	9,838	1,64	1,23	0,82	0,41	0,205	C6H13NO2	131,0946	132,1025	130,0868	149,129	154,0844	190,1079
10 L-Leucine	131,17	9,838	1,64	1,23	0,82	0,41	0,205	C6H13NO2	131,0946	132,1025	130,0868	149,129	154,0844	190,1079
11 L-Lysine	146,19	10,964	1,827	1,371	0,914	0,457	0,228	C6H14N2O2	146,1055	147,1134	145,0977	164,1399	169,0953	205,1188
12 L-Methionine	149,21	11,191	1,865	1,399	0,933	0,466	0,233	C5H11NO2S	149,0511	150,0589	148,0432	167,0854	172,0408	208,0644
13 L-Phenylalanine	165,19	12,389	2,065	1,549	1,032	0,516	0,258	C9H11NO2	165,079	166,0868	164,0712	183,1134	188,0687	224,0923
14 L-Proline	115,13	8,635	1,439	1,079	0,72	0,36	0,18	C5H9NO2	115,0633	116,0712	114,0555	133,0977	138,0531	174,0766
15 L-Serine	105,09	7,882	1,314	0,985	0,657	0,328	0,164	C3H7NO3	105,0426	106,0504	104,0348	123,077	128,0324	164,0559
16 L-Threonine	119,119	8,934	1,489	1,117	0,744	0,372	0,186	C4H9NO3	119,0582	120,0661	118,0504	137,0926	142,048	178,0715
17 L-Tyrosine	181,19	13,589	2,265	1,699	1,132	0,566	0,283	C9H11NO3	181,0739	182,0817	180,0661	199,1083	204,0636	240,0872
18 L-Valine	117,151	8,786	1,464	1,098	0,732	0,366	0,183	C5H11NO2	117,079	118,0868	116,0712	135,1134	140,0687	176,0923
Sigma solution														
MIX2	(ppm)	MIX 2 ppm (dilution of 3x)												
19 Cytidine	50	12,5	2,083	1,563	1,042	0,521	0,26	C9H13N3O5	243,0855	244,0934	242,0777	261,1199	266,0753	302,0988
20 Guanosine	25	6,25	1,042	0,781	0,521	0,26	0,13	C10H13N5O5	283,0917	284,0995	282,0838	301,126	306,0814	342,105
21 Inosine	25	6,25	1,042	0,781	0,521	0,26	0,13	C10H12N4O5	268,0808	269,0886	267,073	286,1152	291,0705	327,0941
22 1-Methyladenosine	25	6,25	1,042	0,781	0,521	0,26	0,13	C11H15N5O4	281,1124	282,1202	280,1046	299,1468	304,1022	340,1257
23 5-Methylcytidine	100	25	4,167	3,125	2,083	1,042	0,521	C10H15N3O5	257,1012	258,109	256,0933	275,1355	280,0909	316,1145

24	2'-O-Methylcytidine 3-Methylcytidine	20	5	0,833	0,625	0,417	0,208	0,104	C10H15N3O5	257,1012	258,109	256,0933	275,1355	280,0909	316,1145
25	methosulfate	100	25	4,167	3,125	2,083	1,042	0,521	C11H19N3O9S	369,0842	370,092	368,0764	387,1186	392,074	428,0975
26	7-Methylguanosine	25	6,25	1,042	0,781	0,521	0,26	0,13	[C11H16N5O5]+	298,1151	299,1229	297,1073	316,1495	321,1049	357,1284
27	5-Methyluridine	50	12,5	2,083	1,563	1,042	0,521	0,26	C10H14N2O6	258,0852	259,093	257,0774	276,1196	281,075	317,0985
28	β-Pseudouridine 2-Thiocytidine	25	6,25	1,042	0,781	0,521	0,26	0,13	C9H12N2O6	244,0695	245,0774	243,0617	262,1039	267,0593	303,0828
29	dihydrate	10	2,5	0,417	0,313	0,208	0,104	0,052	C9H17N3O6S	295,0838	296,0916	294,076	313,1182	318,0736	354,0971
30	Uridine	25	6,25	1,042	0,781	0,521	0,26	0,13	C9H12N2O6	244,0695	245,0774	243,0617	262,1039	267,0593	303,0828
		Carmen solutions	MIX 3												
	Mix 3	(ppm)	(ppm)	BIG MIX (6x diluted)											
31	Citric acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H8O7	192,027	193,0348	191,0192	210,0614	215,0168	251,0403
32	Succinic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C4H6O4	118,0266	119,0344	117,0188	136,061	141,0164	177,0399
33	Malic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C4H6O5	134,0215	135,0293	133,0137	152,0559	157,0113	193,0348
34	2-Oxoglutaric acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H6O5	146,0215	147,0293	145,0137	164,0559	169,0113	205,0348
35	Fumaric acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C4H4O4	116,011	117,0188	115,0032	134,0454	139,0008	175,0243
36	Pimelic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C7H12O4	160,0736	161,0814	159,0657	178,1079	183,0633	219,0869
37	Lactic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C3H6O3	90,03169	91,03952	89,02386	108,0661	113,0215	149,045
	Phosphoenolpyruvic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C3H5O6P	167,9824	168,9902	166,9746	186,0168	190,9721	226,9957
39	Norleucine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H13NO2	131,0946	132,1025	130,0868	149,129	154,0844	190,1079
40	Inositol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H12O6	180,0634	181,0712	179,0556	198,0978	203,0532	239,0767
41	L-carnitine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C7H15NO3	161,1052	162,113	160,0974	179,1396	184,095	220,1185
42	Glucose 6-phosphate	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H13O9P	260,0297	261,0375	259,0219	278,0641	283,0195	319,043
43	Creatinine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C4H7N3O	113,0589	114,0667	112,0511	131,0933	136,0487	172,0722
44	NADH	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C21H29N7O14P2	665,1248	666,1326	664,1169	683,1591	688,1145	724,1381
45	ADP	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H15N5O10P2	427,0294	428,0372	426,0216	445,0638	450,0192	486,0427
46	Adenosine 5'- triphosphate	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H16N5O13P3	506,9958	508,0036	505,9879	525,0301	529,9855	566,0091
47	Guanosine 5'- triphosphate	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H16N5O14P3	522,9907	523,9985	521,9828	541,025	545,9804	582,004

	Mix 4	Stock solutions (ppm)	MIX 4 (ppm)	BIG MIX (6x diluted)											
48	AMP	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H14N5O7P	347,0631	348,0709	346,0553	365,0975	370,0529	406,0764
49	Fructose	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H12O6	180,0634	181,0712	179,0556	198,0978	203,0532	239,0767
50	Epinephrine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C9H13NO3	183,0895	184,0974	182,0817	201,1239	206,0793	242,1028
51	Glucuronic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H10O7	194,0427	195,0505	193,0348	212,077	217,0324	253,056
52	Ribitol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H12O5	152,0685	153,0763	151,0606	170,1028	175,0582	211,0818
53	Tryptamine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H12N2	160,1001	161,1079	159,0922	178,1344	183,0898	219,1134
54	d GTP	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H16N5O14P3	522,9907	523,9985	521,9828	541,025	545,9804	582,004
55	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	[C21H28N7O14P2]+	664,1169	665,1248	663,1091	682,1513	687,1067	723,1303
56	Uridine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C9H12N2O6	244,0695	245,0774	243,0617	262,1039	267,0593	303,0828
57	Inosine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H12N4O5	268,0808	269,0886	267,073	286,1152	291,0705	327,0941
58	Guanosine monophosphate (GMP)	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H14N5O8P	363,058	364,0658	362,0502	381,0924	386,0478	422,0713
59	Glutathione reduced (GSH)	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H17N3O6S	307,0838	308,0916	306,076	325,1182	330,0736	366,0971
60	Dopamine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C8H11NO2	153,079	154,0868	152,0712	171,1134	176,0687	212,0923
61	Serotonin	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H12N2O	176,095	177,1028	175,0871	194,1293	199,0847	235,1083
62	5-Hydroxy-5- hydroxyindoleacetic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H9NO4	191,0582	192,0661	190,0504	209,0926	214,048	250,0715
63	5-Hydroxytryptophan	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C11H12N2O3	220,0848	221,0926	219,077	238,1192	243,0746	279,0981
64	3,4-Dihydroxy-L- phenylalanine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C9H11NO4	197,0688	198,0766	196,061	215,1032	220,0586	256,0821
65	3,4- dihydroxyphenylacetic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C8H8O4	168,148	169,1558	167,1402	186,1824	191,1378	227,1613
66	Homovanillic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C9H10O4	182,0579	183,0657	181,0501	200,0923	205,0477	241,0712
67	3-methoxytyramine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C9H13NO2	167,208	168,2158	166,2002	185,2424	190,1978	226,2213
68	Norepinephrine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C8H11NO3	169,0739	170,0817	168,0661	187,1083	192,0636	228,0872

69	beta-Carotene	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C40H56	536,4382	537,446	535,4303	554,4725	559,4279	595,4515
70	Uracil	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C4H4N2O2	112,0273	113,0351	111,0195	130,0617	135,017	171,0406
71	Ribose	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H10O5	150,0528	151,0606	149,045	168,0872	173,0426	209,0661
72	Uric acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H4N4O3	168,0283	169,0362	167,0205	186,0627	191,0181	227,0416
73	GSSG	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C20H32N6O12S2	612,152	613,1598	611,1442	630,1864	635,1417	671,1653
74	D-glucose-6-phosphate	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C6H13O9P	260,0297	261,0375	259,0219	278,0641	283,0195	319,043
75	Acetylcholine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	[C7H16NO2]+	146,1181	147,1259	145,1103	164,1525	169,1079	205,1314
76	Na acetyl glutamine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C7H12N2O4	188,0797	189,0875	187,0719	206,1141	211,0695	247,093
		Stock solutions (ppm)													
	MIX 5		MIX 5												
77	Estrone	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C18H22O2	270,162	271,1698	269,1542	288,1964	293,1518	329,1753
	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H13N5O5	283,0917	284,0995	282,0838	301,126	306,0814	342,105
79	Estrone sodium	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C18H22O2	270,162	271,1698	269,1542	288,1964	293,1518	329,1753
80	Pyroglutamic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H7NO3	129,115	130,1228	128,1072	147,1494	152,1048	188,1283
81	17-beta-Estradiol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C18H24O2	272,1776	273,1855	271,1698	290,212	295,1674	331,1909
82	Testosterone	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C19H28O2	288,2089	289,2167	287,2011	306,2433	311,1987	347,2222
83	L-thyroxine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C15H11I4NO4	776,6867	777,6945	775,6789	794,7211	799,6765	835,7
84	Palmitic acid	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C16H32O2	256,2402	257,2481	255,2324	274,2746	279,23	315,2535
	Malondialdehyde (MDA)	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C3H4O2	72,02113	73,02895	71,0133	90,0555	95,0109	131,0344
86	Cortisol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C21H30O5	362,2093	363,2171	361,2015	380,2437	385,1991	421,2226
87	Cholesterol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C27H46O	386,3549	387,3627	385,347	404,3892	409,3446	445,3682
88	Putrescine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C4H12N2	88,154	89,16183	87,14617	106,1884	111,1438	147,1673
89	alpha-Tocopherol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C29H50O2	430,3811	431,3889	429,3732	448,4154	453,3708	489,3944
90	Retinol	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C20H30O	286,459	287,4668	285,4512	304,4934	309,4488	345,4723
91	Lutein	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C40H56O2	568,428	569,4358	567,4202	586,4624	591,4177	627,4413
92	Zeaxanthin	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C40H56O2	568,428	569,4358	567,4202	586,4624	591,4177	627,4413
		Stock solutions (ppm)													
	MIX 6		MIX 6												

93	Methionine sulfone Dopamine	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H11NO4S	181,0409	182,0487	180,0331	199,0753	204,0306	240,0542
94	Hydrochloride Serotonin-d4	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C8H11NO2	153,079	154,0868	152,0712	171,1134	176,0687	212,0923
95	Hydrochloride	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C10H12N2O	176,095	177,1028	175,0871	194,1293	199,0847	235,1083
96	Acetylcholine d9* Choline chloride-1-	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	[C7H16NO2]+	146,1181	147,1259	145,1103	164,1525	169,1079	205,1314
97	13C	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C5H14ClNO	139,0764	140,0842	138,0686	157,1108	162,0662	198,0897
98	PIPES 3,3',5-TRIiodo-L-	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C8H18N2O6S2	302,0606	303,0685	301,0528	320,095	325,0504	361,0739
99	THYRONINE:HCL (T3)	1000	10	1,667	1,25	0,833	0,417	0,208	C15H12I3NO4	650,7901	651,7979	649,7823	668,8245	673,7799	709,8034
Lipid MIX	Triheptadecanoate 1,2,3- triheptadecanoyl-glycerol	20 µM	0.02mM						C54H104O6	848,7833	849,7911	847,7755	866,8172	871,7731	907,7971
	1-(10Z-heptadecenoyl)-sn- glycero-3-phosphoethanolamine	20 µM	0.02mM						C22H44NO7P	465,2855	466,2934	464,2777	483,3194	488,2753	524,2993
	1-(10Z-heptadecenoyl)-sn- glycero-3-phospho-(1'-rac- glycerol)	20 µM	0.02mM						C23H44O9PNa	518,2621	519,2699	517,2542	536,296	541,2519	577,2759
	1-hexadecanoyl(d31)-2-(9Z- octadecenoyl)-sn-glycero-3- phosphoethanolamine	20 µM	0.02mM						C39H45D31NO8P	748,7254	749,7333	747,7176	766,7593	771,7152	807,7392
	N-[(2S,3R,4E)-3-hydroxy-1- {[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5- trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2- yl]oxy}octadec-4-en-2- yl]dodecanamide	20 µM	0.02mM						C36H69NO8	643,5023	644,5102	642,4945	661,5362	666,4921	702,5161
	N-[(2S,3R,4E)-1,3- dihydroxyoctadec-4-en-2- yl]dodecanamide	20 µM	0.02mM						C30H59NO3	481,4495	482,4573	480,4417	499,4834	504,4393	540,4633
		20 µM	0.02mM						C17H37NO2	287,2824	288,2903	286,2746	305,3163	310,2722	346,2962



SETAC EUROPE 32ND ANNUAL MEETING

TOWARDS A REDUCED POLLUTION SOCIETY



12 October 2022

This letter is to verify that **Flavia Yamamoto** (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP, Brazil) attended and participated at the SETAC Europe 32nd Annual Meeting in Copenhagen, Denmark from 15-19 May 2022.

The following presentation was presented:

Presentation Type: Poster

Presentation Title: Exploring Chemical and Biological Data to Understand the Impacts of the Pollutants in the Doce River, Brazil, After the Mining Dam Collapse

Session: Contaminated sediment: an environmental compartment of concern (Poster)

Authors: F.Y.Yamamoto, A.Padial, R.Tauler, D.Abessa

Bart Bosveld

SETAC Global Executive Director

**18TH ANNUAL WORKSHOP ON EMERGING HIGH-RESOLUTION
MASS SPECTROMETRY (HRMS)
AND LC-MS/MS APPLICATIONS IN ENVIRONMENTAL ANALYSIS
AND FOOD SAFETY**

BARCELONA, 10-11 OCTOBER 2022

CERTIFICATE

**Flávia Yamamoto, Carmen Bedia Girbés, Silvia Lacorte Bruguera, Denis Moledo de Souza
Abessa, Romà Tauler**

**Have presented the POSTER entitled: *LC-HRMS-based metabolomics as a powerful approach
to elucidate mechanisms of action of environmental chemicals from Doce River in brazilian
fish embryos***



Damià Barcelò
Chair of the Scientific Committee

BARCELONA, 11 OCTOBER 2020



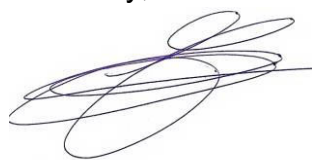
Barcelona, March 12th 2023

To Whom May Concern

Scientific Report Assessment of the the Research Internship Abroad (BEPE-FAPESP),
presented by the PhD candidate **Flávia Yoshie Yamamoto**,
with title: '**Metabolomics as a powerful approach to elucidate mechanisms of
action of environmental chemicals from Doce River in brazilian fish embryos**',
Supervisor: Denis Moledo S. Abessa ; Host Supervisor: Romà Tauler Ferré
Institution: Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA),
Barcelona, Spain
Process number: 2020/14688-8; Period of activities: 04/01/2023 – 30/12/2023

I am delighted to provide a positive report on the exceptional work carried out by Flavia Yamamoto during her research internship at our chemometrics laboratory in the IDAEA-CSIC institute in Barcelona. Throughout her tenure, Flavia demonstrated an exceptional understanding of metabolomics and chemometric methods, rapidly progressing in her application of these techniques. Her remarkable efforts are reflected in the three publications she has been working on. The first manuscript is ready for submission, while the other two are in advanced preparation. All experimental work and data analysis tasks have been completed, and the final reports are now being prepared. Flavia's contributions have been instrumental in advancing our research work in new data analysis approaches for the non-target analysis of environmental pollutants and their effects on the endogenous metabolomics system of exposed biological organisms. Her work has provided significant insights and has allowed us to make significant progress in our research endeavours. In summary, I strongly recommend a favourable evaluation of Flavia Yamamoto's internship activities and reports. We are extremely pleased with her work and the value she has added to our research work.

Sincerely,



Prof. Dr. Roma Tauler
e-mail: Roma.Tauler@idaea.csic.es,
Institute of Environmental Assessment and Water Research
IDAEA-CSIC, <http://www.idaea.csic.es/>

Relatório de atividades de divulgação e transferência dos conhecimentos adquiridos

Minicurso de METABOLÔMICA

Título: Abordagem metabolômica para a avaliação dos mecanismos de ação das misturas de contaminantes ambientais em embriões de peixes brasileiros

Bolsista PD: Dra. Flávia Yoshie Yamamoto

Supervisor: Prof. Denis Moledo de Souza Abessa

Processo FAPESP 2020/14688-8

O minicurso de Metabolômica ofertado entre os dias 01/03/2023 a 07/03/2023 foi elaborado de acordo com o plano de transferência adquirido no exterior, conforme proposto inicialmente no Projeto da BEPE. Os alunos do grupo NEPEA foram informados sobre a realização do minicurso com mais de 1 mês de antecedência da data e o cronograma foi disponibilizado com mais de 15 dias antes do início do minicurso. Uma semana antes do início, foi criado um grupo no aplicativo *WhatsApp* para os alunos que se demonstraram interessados (10 alunos/pós-doutorandos) em participar, onde foram disponibilizadas todas as informações referentes ao minicurso.

Foram realizadas 4 aulas teóricas e 4 aulas práticas presenciais, cada uma com duração aproximada de 2h, totalizando 16 horas de minicurso. As aulas teóricas foram realizadas na sala 5 enquanto as aulas práticas foram ministradas no Laboratório Didático e na sala de Bioinformática do Instituto de Biosciências da UNESP, Campus Litoral Paulista. Além das aulas do minicurso, também foi apresentado um seminário (Salão Nobre do campus) de duração de aproximadamente 2h (apresentação em pdf. Anexada em outros documentos no SAGE), referente ao trabalho desenvolvido no exterior, de acordo com o cronograma abaixo:

Cronograma das aulas do minicurso e seminário

	SEG	TER	QUA	QUI	SEX
<i>Data /horário</i>	<i>27/02</i>	<i>28/02</i>	<i>01/03</i>	<i>02/03</i>	<i>03/03</i>
10:00-12:00			Minicurso	<i>Seminário</i>	Minicurso
14:00-16:00			dia 1	<i>Flávia</i> <i>(10:00-12:00)</i> <i>*Leitura</i> <i>textos</i>	Y.dia 2
<i>Data</i>	<i>06/03</i>	<i>07/03</i>	<i>08/03</i>	<i>09/03</i>	<i>10/03</i>
10:00-12:00	Minicurso	Minicurso			<i>Entrega de</i>
14:00-16:00	dia 3	dia 4			<i>formulário de</i> <i>avaliação do</i> <i>curso</i>

Aulas teóricas: 10:00-12:00h (sala 5)

Aulas práticas-interativas: 14:00-16:00h (laboratório Didático dia 03/03 e 06/03, Informática dia 08/03)

** Leitura de textos sugeridos entre os dias de curso*

Os temas abordados nas aulas foram divididos em 5 principais tópicos

- Misturas de contaminantes ambientais
- Aplicação da abordagem metabolômica não-alvo na ecotoxicologia
- Testes de toxicidade com embriões de peixes
- Princípios das técnicas de LC-HRMS para a análise de metabólitos
- Análise de dados obtidos na abordagem metabolômica não-alvo através das análises estatísticas e multivariadas

Estes temas foram divididos em quatro aulas teóricas e práticas de acordo com a seguinte descrição (as aulas em pdf. foram anexadas em outros Documentos no Sage).

Minicurso dia 1 (01/03)

A aula teórica do primeiro dia abordou os seguintes temas:

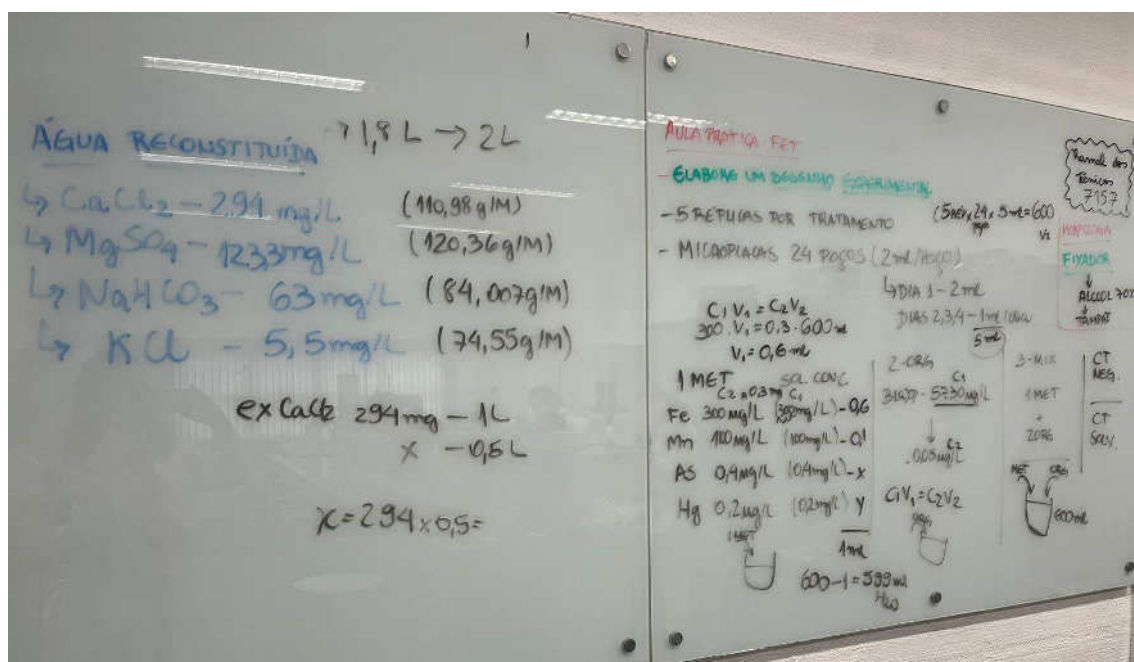
- Contaminantes ambientais e as misturas complexas: As etapas da ecotoxicologia para o estudo da mobilidade e efeitos dos contaminantes ambientais; Fontes, transporte e destino dos contaminantes nas matrizes ambientais; Misturas complexas (conceitos e desafios atuais) e interações químicas (efeito aditivo, sinergia, antagonismo); Estado da arte para a detecção dos contaminantes ambientais com ênfase para as vantagens e desvantagens entre as abordagens alvo (*target*) e não-alvo (*untarget*); Exposoma (conceito e estudos), Exemplos de estudos da avaliação dos efeitos de misturas de contaminantes em organismos aquáticos
- Ferramentas moleculares na Ecotoxicologia: As análises moleculares como importantes ferramentas para a elucidação dos mecanismos de ação dos contaminantes ambientais; Vantagens e desvantagens das análises moleculares na Ecotoxicologia;
- Abordagens Ômicas e a Metabolômica: Aplicações das abordagens ômicas na ecotoxicologia; Genômica e Transcriptômica; Metabolômica e lipidômica; descoberta de novos biomarcadores. Estudos com a abordagem Multi-ômicas e associação com o Exposoma.

Aula prática

Cálculo para o preparo de soluções de misturas químicas de substâncias inorgânicas e orgânicas.

Os alunos calcularam o volume de solução necessária para o preparo de água reconstituída, fornecendo as concentrações dos sais a serem utilizados (CaCl₂ 294,0 mg L⁻¹, MgSO₄ 123,3 mg L⁻¹, KCl 5,7 mg L⁻¹ and NaHCO₃ 64,7 mg L⁻¹) de acordo com a OECD 203 guidelines (1992). Um experimento hipotético com três tratamentos distintos (uma solução de mistura de metais (Fe a 0,3 mg L⁻¹, Mn a 0,1 mg L⁻¹, As a 0,4 µg L⁻¹ e Hg a 0,2 µg L⁻¹), outra de extrato de orgânicos do sedimento (diluição conforme concentração de BaP a 0,05 µg L⁻¹) e uma última da mistura de ambos). Os alunos deveriam considerar a

exposição em microplacas de 24 poços, com a realização de 4 réplicas por tratamento e grupos controles.



Minicurso dia 2 (03/03)

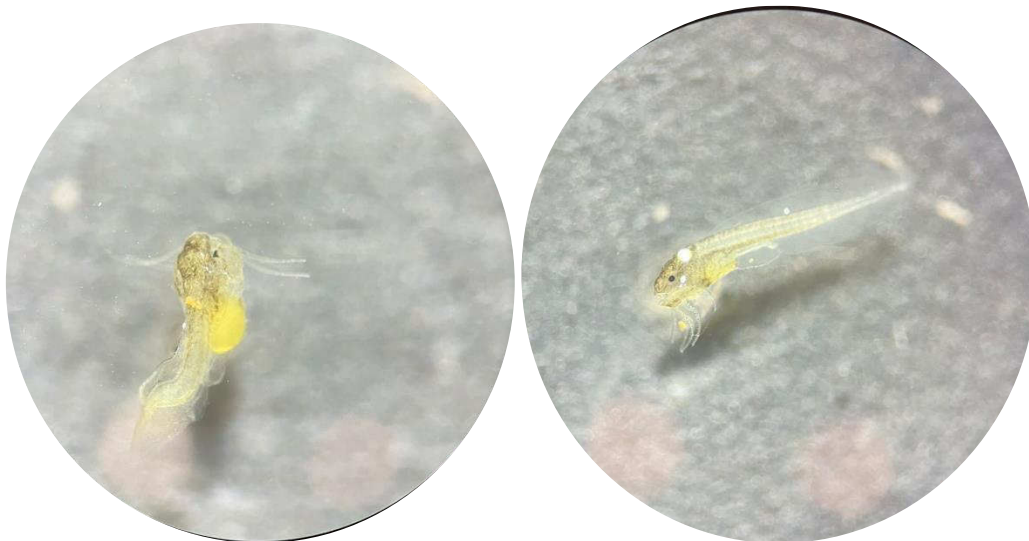
Aula teórica

Testes de toxicidade com embriões de peixes: Testes de toxicidade (condições ideais, fatores que interferem na toxicidade, ensaio de toxicidade agudo e crônico); Escolha do organismo de estudo, com ênfase para espécies de peixes nativas; Principais modelos de peixes pequenos como modelos de estudo; Desenho experimental dos testes de toxicidade com embriões de peixes de acordo com metodologia da OECD (FET 236); Metodologia experimental; Análises das respostas morfológicas para a avaliação da toxicidade; Modelagem matemática para prever efeitos a níveis populacionais e a longo prazo; principais espécies de peixes nativas utilizadas nos testes de toxicidade com embriões de peixes; Estudos de metabolômica com embriões de peixes de zebrafish.

Aula prática

Observações das deformidades em embriões de peixes *Rhamdia quelen* fixados (obtidos nos experimentos realizados no pós-doutorado) através da microscopia de luz foram

realizadas com a utilização de duas lupas. Os alunos tiveram que diferenciar os principais tipos de deformidades nos embriões: axiais (lordose, cifose, esclerose), torácicas (edemas cardíaco e saco vitelínico), faciais (desenvolvimento dos barbilhões e dos olhos e boca), deformidades nas nadadeiras.



Minicurso dia 3 (06/03)

Aula teórica

Extração de metabólitos e a Cromatografia líquida de alta resolução: i) Extrações sólido-líquido de amostras biológicas com a utilização de solventes químicos; Utilizações de padrões de metabólitos para análise direcionada (target); Princípios da cromatografia líquida (permeação em gel, troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade); Separações cromatográficas com uso de HPLC (Fase reversa e fase normal); Vantagens e desvantagens da cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC); Princípios da espectrometria de massas (relação carga/massa, etapas de ionização, aceleração, deflexão e detecção dos íons); Espectrômetria por tempo de voo (QTOF) e fonte de ionização por eletrospray (ESI), Analisadores Triplo-quadrupolo; Aquisição dependente/independente dos dados; Interpretação dos dados obtidos em cromatogramas de Espectrometria de massas de alta resolução.

Aula prática

Extração de metabólitos em organismos aquáticos: os alunos reproduziram um esquema metodológico representativo das etapas necessárias para a extração dos metabólitos em amostras biológicas de cérebros de peixes com o uso de solventes orgânicos (metanol e clorofórmio), de acordo com o protocolo em anexo.

Foram realizadas as etapas:

- 1- Pesagem das amostras descongeladas (50 mg)
- 2- Adição de 0,9 ml de metanol gelado
- 3- Homogeneização das amostras em tissue lyzer 40 Hz por 4 min
- 4- Adição de 0,3 ml de água ultra pura e 0,4 ml de clorofórmio
- 5- Agitação das amostras por vórtex 15 seg e banho sonicator por 20 min
- 6- Amostras permaneceram no gelo por 10 min
- 7- Centrifugação das amostras a 20.000 g por 10 min a 4° C
- 8- Separação das fases aquosa e insolúvel.

9-



Minicurso dia 4 (08/03)

Aula teórica

Análise de dados na abordagem não-alvo: Diferenças entre as abordagens da metabolômica alvo e não-alvo; Etapas da análise de dados (importação de dados brutos, armazenamento e pré-processamento dos dados brutos); Abordagem ROIMCR: compressão dos dados através da abordagem Regiões de interesse (ROI), seleção dos parâmetros, Resolução multivariada de curvas (MCR) e sua aplicabilidade para a análise simultânea de dados LC-MS1_MS2 de aquisição independente. Exemplo dos resultados obtidos no exterior para padrões de aminoácidos e para as amostras dos embriões de peixes.

Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de componentes simultâneo e análise de variância (ASCA); Análise de dados e a identificação de metabólitos com o Software MS-DIAL; Identificação das vias afetadas com o software METABOANALYST.

Aula prática

Identificação de metabólitos (aminoácidos) através do software MS-DIAL (foram utilizados os computadores disponíveis no laboratório de informática). Dados brutos de amostras contendo aminoácidos foram fornecidos para a prática e os parâmetros para a

análise foram apresentados e simulados em sala de aula. Os alunos aprenderam a identificar os metabólitos de acordo com o banco de dados disponíveis, comparando os espectros obtidos nas amostras e o disponibilizado pelo software MS-DIAL (verificando e comparando os scores de pontuação dos metabólitos tanto na seleção “*reference matched*” como em “*suggested ions*”).

Durante o curso, foi disponibilizado um material de apoio para leitura sobre os temas abordados nas aulas, em uma pasta compartilhada na plataforma onedrive, contendo:

- Aula 1 com sugestão de leitura de 15 artigos (Alonso et al., 2015; Atsdr, 2018; Canuto et al., 2018; Dai & Shen, 2022; EPA, 1986; Escher et al., 2020; Gibson et al., 2019; Hasin et al., 2017; Ikeda, 1995; Jamnik et al., 2022; Maitre et al., 2022; Min et al., 2021; SCHER et al., 2012; Schrimpe-Rutledge et al., 2016; Villasclaras et al., 2022) ; Aula 2 com 12 artigos (Barreto et al., 2020; Brito et al., 2017; Campagna et al., 2006; U. S. E. P. A. EPA, 1986; Feitosa et al., 2021; Jamnik et al., 2022; Lammer et al., 2009; Maitre et al., 2022; OECD, 2013; Ortiz-Villanueva et al., 2017, 2018; Villasclaras et al., 2022; Zebal et al., 2018); Aula 3 com 7 artigos (Buszewski & Noga, 2012; Guo & Huan, 2020; Kohler et al., 2022; Shandilya et al., 2016; Tsugawa et al., 2015; Urban et al., 2014; Vessicchi et al., 2011); Aula 4 com 7 artigos (Bertinetto et al., 2020; Jansen et al., 2005; Lai et al., 2018; Marçõ et al., 2014; Pérez-Cova et al., 2021, 2022; Tada et al., 2019; Tsugawa et al., 2015).
- Apresentações das aulas teóricas ministradas em sala
- Protocolo de extração de metabólitos polares e apolares e da técnica de LC-HRMS utilizado no exterior para a detecção dos metabólitos nas amostras dos embriões de peixes
- Dados brutos de solução padrão de mistura de aminoácido para análise de dados no software MS-DIAL

Link da pasta no onedrive:

https://1drv.ms/u/s!Ar0UE1ZgAjKtgcEmqUUPiqr_d9Egwx?e=bFTBw0

O minicurso teve como principal objetivo transmitir os conhecimentos adquiridos no exterior, enfatizando sobre a utilização das técnicas mais avançadas na abordagem da metabolômica não-alvo para a sua aplicação dentro da área de pesquisa

da ecotoxicologia. Além da metabolômica, foi destacado o emprego das análises químicas não-alvo para a detecção de múltiplos contaminantes orgânicos nos ambientes aquáticos. Foi demonstrado no minicurso que ambas as técnicas podem ser associadas sob diferentes condições experimentais para possibilitar uma compreensão mais global da relação entre a exposição a múltiplos contaminantes e os mecanismos de ação desencadeados, o qual representa uma das questões chaves de maior interesse dentro do ramo da ecotoxicologia.

Apesar de um número relativamente baixo de alunos participantes no minicurso (6 alunos em média/aula), foi possível verificar um grau de aprendizado e interesse satisfatório dos mesmos ao longo do minicurso, o que fica evidenciado pela avaliação do minicurso de acordo com a pesquisa realizada apresentada em anexo (Formulário de avaliação do minicurso).



Referências utilizadas para o minicurso

- Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 3, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>
- Atsdr. (n.d.). *GUIDANCE MANUAL FOR CHEMICAL MIXTURES*.
- Atsdr. (2018). *Framework for Assessing Health Impacts of Multiple Chemicals and Other Stressors (Update)*.
- Barreto, L. S., Souza, A. T. da C., Martins, C. C., Araujo, S. B. L., & Oliveira Ribeiro, C. A. de. (2020). Urban effluents affect the early development stages of Brazilian fish species with implications for their population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109907>
- Bertinetto, C., Engel, J., & Jansen, J. (2020). ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. In *Analytica Chimica Acta: X* (Vol. 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2020.100061>

- Brito, I. de A., López-Barrera, E. A., Araújo, S. B. L., & Ribeiro, C. A. de O. (2017). Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. *Ecological Modelling*, 347, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.12.017>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 402, Issue 1, pp. 231–247). <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Campagna, A. F., Rêgo, D. O., & Silva, L. O. L. (2006). DIMETHOATE 40% ORGANOSPHOROUS PESTICIDE TOXICITY IN *Prochilodus lineatus* (PROCHILODONTIDAE, CHARACIFORMES) EGGS AND LARVAE. In *Braz. J. Biol* (Vol. 66, Issue 2B).
- Canuto, G. A. B., Da Costa, J. L., Da Cruz, P. L. R., De Souza, A. R. L., Faccio, A. T., Klassen, A., Rodrigues, K. T., & Tavares, M. F. M. (2018). METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. In *Química Nova* (Vol. 41, Issue 1, pp. 75–91). Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>
- Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.911861>
- EPA, E. P. (n.d.). *Risk assessment of complex mixtures EPA*.
- EPA, U. S. E. P. A. (1986). *Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures*.
- Escher, B. I., Stapleton, H. M., & Schymanski, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367, 388–392. www.norman-network.com/nds/
- Feitosa, N. M., Calderon, E. N., da Silva, R. N., de Melo, S. L. R., Souza-Menezes, J., Nunes-Da-Fonseca, R., & Reynier, M. V. (2021). Brazilian silverside, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1825) embryos as a test-species for marine fish ecotoxicological tests. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11214>
- Gibson, E. A., Goldsmith, J., & Kioumourtzoglou, M. A. (2019). Complex Mixtures, Complex Analyses: an Emphasis on Interpretable Results. In *Current environmental health reports* (Vol. 6, Issue 2, pp. 53–61). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40572-019-00229-5>
- Guo, J., & Huan, T. (2020). Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 92(12), 8072–8080. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05135>
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusi, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. In *Genome Biology* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
- Ikeda, M. (1995). Toxicology Letters Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. In *Toxicology Letters* (Vol. 77). ELSEVIER.
- Jamnik, T., Flasch, M., Braun, D., Fareed, Y., Wasinger, D., Seki, D., Berry, D., Berger, A., Wisgrill, L., & Warth, B. (2022). Next-generation biomonitoring of the early-life chemical

- exposome in neonatal and infant development. *Nature Communications*, 13(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30204-y>
- Jansen, J. J., Hoefsloot, H. C. J., Van Der Greef, J., Timmerman, M. E., Westerhuis, J. A., & Smilde, A. K. (2005). ASCA: Analysis of multivariate data obtained from an experimental design. *Journal of Chemometrics*, 19(9), 469–481. <https://doi.org/10.1002/cem.952>
- Kohler, I., Verhoeven, M., Haselberg, R., & Gargano, A. F. G. (2022). Hydrophilic interaction chromatography – mass spectrometry for metabolomics and proteomics: state-of-the-art and current trends. *Microchemical Journal*, 175.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106986>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Ogiwara, A., Meissen, J., Showalter, M., Takeuchi, K., Kind, T., Beal, P., Arita, M., & Fiehn, O. (2018). Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods*, 15(1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(2), 196–209.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Maitre, L., Bustamante, M., Hernández-Ferrer, C., Thiel, D., Lau, C. H. E., Siskos, A. P., Vives-Usano, M., Ruiz-Arenas, C., Pelegrí-Sisó, D., Robinson, O., Mason, D., Wright, J., Cadiou, S., Slama, R., Heude, B., Casas, M., Sunyer, J., Papadopoulou, E. Z., Gutzkow, K. B., ... Vrijheid, M. (2022). Multi-omics signatures of the human early life exposome. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34422-2>
- Março, P. H., Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., & Tauler, R. (2014). Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: Descrição, funcionamento e aplicações. In *Química Nova* (Vol. 37, Issue 9, pp. 1525–1532).
<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140205>
- Min, E. K., Lee, A. N., Lee, J. Y., Shim, I., Kim, P., Kim, T. Y., Kim, K. T., & Lee, S. (2021). Advantages of omics technology for evaluating cadmium toxicity in zebrafish. In *Toxicological Research* (Vol. 37, Issue 4, pp. 395–403). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s43188-020-00082-x>
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, July*, 1–22.
<https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OECD/OCDE 2. (n.d.).
- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, 635, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369>
- Ortiz-Villanueva, E., Navarro-Martín, L., Jaumot, J., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Piña, B., & Tauler, R. (2017). Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach. *Environmental Pollution*, 231, 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.095>

- Pérez-Cova, M., Bedia, C., Stoll, D. R., Tauler, R., & Jaumot, J. (2021). MSroi: A pre-processing tool for mass spectrometry-based studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 215(April). <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104333>
- Pérez-Cova, M., Platikanov, S., Stoll, D. R., Tauler, R., & Jaumot, J. (2022). *molecules* Comparison of Multivariate ANOVA-Based Approaches for the Determination of Relevant Variables in Experimentally Designed Metabolomic Studies. <https://doi.org/10.3390/molecules27103304>
- SCHER, SCCS, & SCENIHR. (2012). *Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*. <https://doi.org/10.2772/21444>
- Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., & McLean, J. A. (2016). Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(12), 1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- Shandilya, D. K., Joseph, P. E., & Kantamreddi, V. S. S. (2016). Interpretation of full scan atmospheric pressure ionization mass spectra (MS) and collision induced dissociation fragmentation spectra (MS/MS) of small organic molecules - A mini review. In *Systematic Reviews in Pharmacy* (Vol. 8, Issue 1, pp. 48–51). <https://doi.org/10.5530/srp.2017.1.9>
- Tada, I., Tsugawa, H., Meister, I., Zhang, P., Shu, R., Katsumi, R., Wheelock, C. E., Arita, M., & Chaleckis, R. (2019). Creating a reliable mass spectral–retention time library for all ion fragmentation-based metabolomics. *Metabolites*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/metabo9110251>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., Vanderghenst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12(6), 523–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Urban, J., Afseth, N. K., & Štys, D. (2014). Fundamental definitions and confusions in mass spectrometry about mass assignment, centroiding and resolution. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 53, pp. 126–136). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.010>
- Vessecchi, R., Lopes, N. P., Gozzo, F. C., Dörr, F. A., Murgu, M., Lebre, D. T., Abreu, R., Bustillos, O. V., & Riveros, J. M. (2011). NOMENCLATURAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM LÍNGUA PORTUGUESA. In *Quim. Nova* (Vol. 34, Issue 10).
- Villasclaras, P., Jaén, C., van Drooge, B. L., Grimalt, J. O., Tauler, R., & Bedia, C. (2022). Phenotypic and Metabolomic Characterization of 3D Lung Cell Cultures Exposed to Airborne Particulate Matter from Three Air Quality Network Stations in Catalonia. *Toxics*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/toxics10110632>
- Zebral, Y. D., Lansini, L. R., Costa, P. G., Roza, M., Bianchini, A., & Robaldo, R. B. (2018). A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. *Chemosphere*, 196, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.196>

Formulário de avaliação do Minicurso de Metabolômica (01/03/2023 a 08/03/2023)

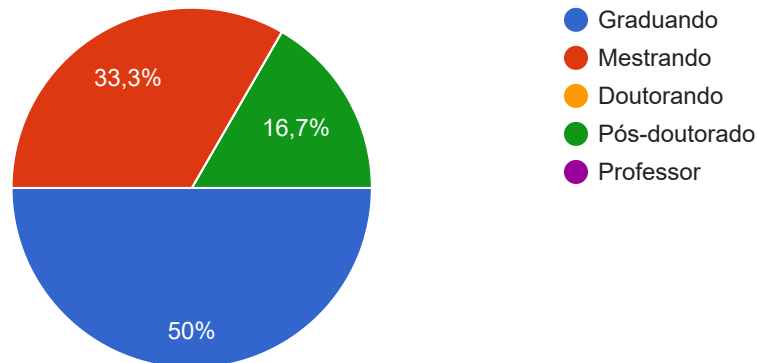
6 respostas

[Publicar análise](#)

Qual o seu nível de formação acadêmica?

 Copiar

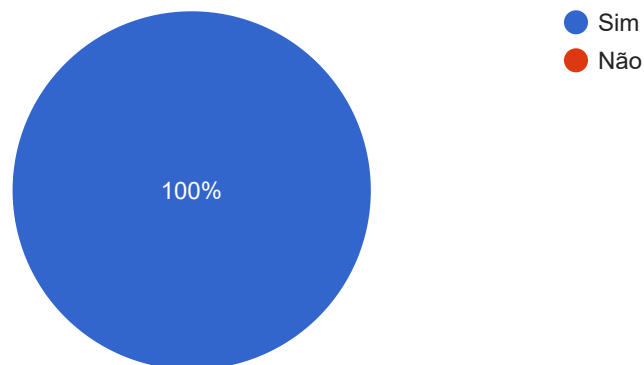
6 respostas



Você faz parte do grupo NEPEA?

 Copiar

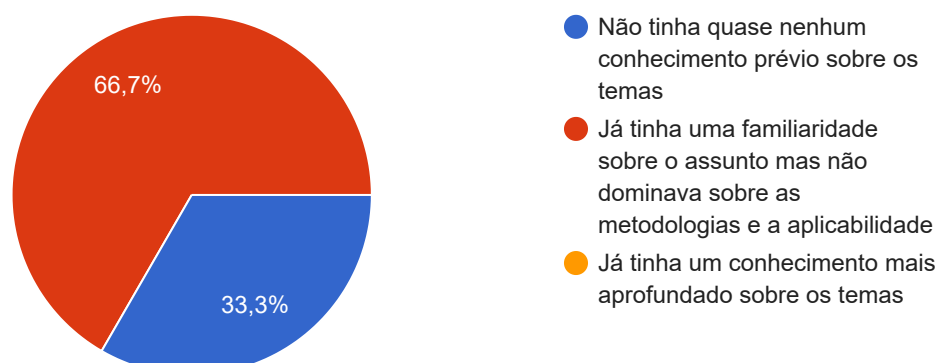
6 respostas



Qual o nível de conhecimento sobre os temas abordados antes do curso?

 Copiar

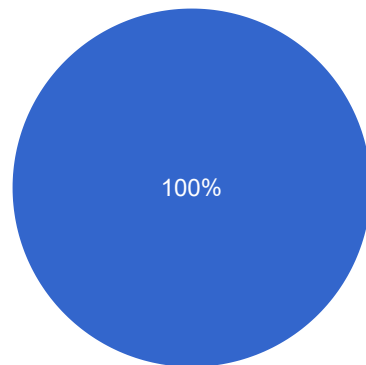
6 respostas



Qual o nível de complexidade e de aprendizado sobre os temas abordados após o curso?

 Copiar

6 respostas

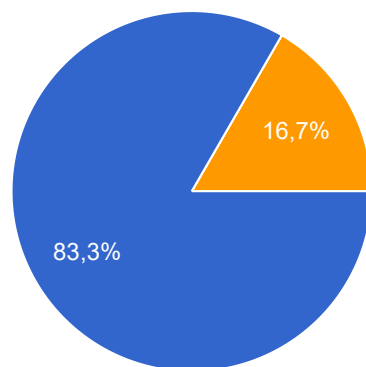


- Apesar da grande complexidade dos temas apresentados, foi possível obter um nível de conhecimento satisfatório
- Temas muito complexos onde não foi possível obter um conhecimento significativo durante o minicurso
- Pouca complexidade dos temas, e portanto, fácil de se obter conhecimento

Qual o nível de aprendizado sobre os temas com relação à duração do curso?

 Copiar

6 respostas

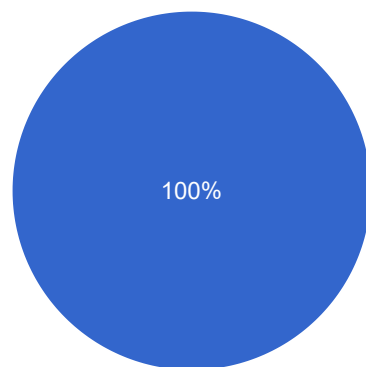


- Curso intensivo de curta duração, com muito conteúdo apresentado, porém suficiente para adquirir um nível de conhecimento satisfatório
- Curso intensivo de curta duração, com muita informação e insuficiente para adquirir um nível de conhecimento satisfatório
- Duração do curso apropriada e suficiente para adquirir um nível adequado de conhecimento

Qual a contribuição das aulas práticas para aquisição do conhecimento?

 Copiar

6 respostas



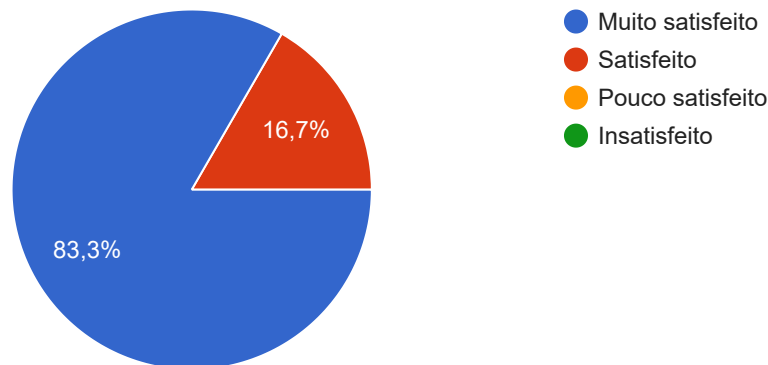
- As aulas práticas foram fundamentais para contribuir na aquisição do conhecimento dos temas abordados
- As aulas práticas foram insuficientes e não contribuíram significativamente para a aquisição do conhecimento



Qual o seu nível de satisfação geral com o minicurso ofertado?

 Copiar

6 respostas



Algum comentário específico (elogios ou críticas)?

4 respostas

Fico grata pelo minicurso ofertado e curiosa em talvez seguir essa linha mais para frente na vida acadêmica.

Achei que o curso foi ministrado com maestria. Mesmo com a complexidade do tema e o publico diverso, acho que as informações foram passadas de modo que houve uma ótima absorção.

A unica diferença que eu poderia querer era terem mais dias para conseguirmos discutir e aproveitar mais ainda sobre o tema

Parabéns e muito sucesso em sua carreira

Adorei a professora, com abordagem clara e bem dinâmica. Da pra ver que ela sabe o conteúdo em que está passando. Parabéns. Gostaria de ter outros cursos como este pois foi relevante pra mim, foi importante pois nao tinha conhecimento nem mesmo do próprio título do curso kkk.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)

Google Formulários



