UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE DOS POLUENTES DO RIO DOCE ATRAVÉS DAS ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS NO FÍGADO DOS PEIXES

São Vicente - SP

2021

KAORI ONISHI

AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE DOS POLUENTES DO RIO DOCE ATRAVÉS DAS ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS NO FÍGADO DOS PEIXES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas – Habilitação em Biologia Marinha da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus do Litoral Paulista como requisito à obtenção do título de Bióloga Marinha.

Orientador: Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Co-orientadora: Flávia Yoshie Yamammoto

SÃO VICENTE - SP

2021

O58a

Onishi, Kaori

AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE DOS POLUENTES DO RIO DOCE ATRAVÉS DAS ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS NO FÍGADO DOS PEIXES / Kaori Onishi. -- São Vicente, 2022

51 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

Coorientadora: Flávia Yoshie Yamamoto

1. histologia. 2. bagres. 3. desastre de Mariana. 4. ecotoxicologia. 5. poluição aquática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos:

Primeiramente, gostaria de agradecer ao professor Dr. Denis Moledo de Souza Abessa por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e por todo o auxílio e paciência na produção deste trabalho, mesmo durante a atual pandemia. À Dra. Flávia Yoshie Yamamoto, que me ensinou e ajudou em diversos momentos, desde a coleta até as análises e produções de texto, e me acompanhou nesta jornada como uma amiga.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro fornecido.

Aos meus pais que estiveram sempre me apoiando e incentivando meus estudos e pesquisa de toda maneira que conseguiram. Agradeço a minha irmã que me fez companhia por muitas horas durante a produção do trabalho. À minha família, em especial o meu tio, Mitsu, que me incentivou e ajudou quando precisei ir para Curitiba.

Agradeço também aos meus amigos Simon e Rafa que sempre estiveram lá para me incentivar, apoiar e torcer por mim.

Também gostaria de agradecer ao grupo do NEPEA (Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática – UNESP CLP) que me acolheu e recebeu de braços abertos, sempre sendo bem receptíveis e companheiros. Ao grupo do Laboratório de Toxicologia Celular (UFPR – Curitiba), coordenado pelo professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, que me receberam por um curto período em uma parceria. Ao grupo do LABMA (Laboratório de Morfologia Animal – UNESP CLP) que sempre esteve disposto a me auxiliar em muitos momentos.

Agradeço à UNESP (Universidade Estadual Paulista - CLP) pela oportunidade de estudo e por todos os ensinamentos que foram transmitidos.

SUMÁRIO

RESUMO 5

ABSTRACT 6

1. INTRODUÇÃO 8

1.1 Bacia do rio Doce 8

1.2 Poluentes orgânicos e inorgânicos 10

1.3 Biomarcadores 14

2. OBJETIVOS 17

2.1 Objetivo geral 17

2.2 Objetivos específicos 17

3. MATERIAIS E MÉTODOS 18

3.1 Área de estudo 18

3.2 Coletas 19

3.3 Histologia 21

3.4 Análises estatísticas 27

4. RESULTADOS 28

4.1 Análises químicas e Dados pluviométricos 33

5. DISCUSSÃO 37

6. CONCLUSÃO 42

6. BIBLIOGRAFIA 43

7. ANEXO 47

RESUMO

A bacia do rio Doce representa um conjunto de corpos hídricos de grande relevância ambiental e socioeconômica, os quais têm sido cronicamente contaminados por diversas atividades antrópicas. Mais recentemente, o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG), liberou enorme quantidade de resíduos de mineração, adicionando uma grande carga de contaminantes em toda a extensão da bacia hidrográfica. Considerando que os contaminantes podem prejudicar a saúde dos peixes nativos, e que nesses organismos o fígado é um órgão alvo de chave no metabolismo dos xenobióticos, este estudo teve como objetivo avaliar a hepatotoxicidade em peixes do rio Doce através da histopatologia do fígado de indivíduos de diferentes espécies de bagres e cascudos (*Rhamdia quelen*, *Trachelyipterus atriatulus*, *Pimelodus maculatus*, *Rineloricaria lanceolata*, *Glanidium botocudo*, *Loricaria coximensis*, *Hypostomus* sp., *Lophiosilurus alexandri*), coletados em 8 localidades distribuídas ao longo da bacia, e em dois períodos diferentes (chuvoso e seco de 2019). Cerca de 15 peixes foram coletados por ponto, pesados, sacrificados e seus fígados foram removidos e fixados. Lâminas preparadas com cortes de 5 µm de espessura e coradas em Hematoxilina/Eosina foram analisadas aleatoriamente por microscopia óptica, seguindo critérios padronizados para identificar e quantificar as alterações histopatológicas, classificadas de acordo com o grau de reversibilidade de cada lesão. Os dados obtidos foram organizados para realizar o teste de normalidade de D'Agostino Pearson e o teste de Kruskal-Wallis. No período chuvoso houve uma maior inconstância nas respostas histopatológicas o que pode ser justificado pela maior diversidade de espécies capturadas. Já no período seco, as respostas histopatológicas foram mais constantes, apresentando altos índices de centros de melanomacrófagos, infiltrações leucocitárias e necrose. No geral, os índices de alterações histopatológicas foram baixos, mas os pontos

que apresentaram mais alterações graves como a necrose estavam localizados no alto rio Doce, onde há mais contaminantes inorgânicos. Já no médio e baixo rio Doce, foram observadas uma elevada quantidade de alterações relacionadas ao sistema imune dos indivíduos.

Palavras-chave: histologia, bagres, cascudos, desastre de Mariana, ecotoxicologia, poluição aquática

ABSTRACT

The Doce River basin (DRB) includes a set of water bodies of great environmental and socioeconomic relevance, which have been chronically contaminated by various human activities. The rupture of the Fundão dam, in Mariana (MG), released a huge amount of mining waste, adding a large load of contaminants throughout the watershed. Because such contaminants can harm the health of native fish, and that the liver of these organisms is a key target organ for the metabolism of xenobiotics, this study aimed to evaluate the hepatotoxicity in fish from Doce river through the use of histopathological analysis of livers from individuals of different species of catfish (*Rhamdia quelen*, *Trachelyipterus atriatulus*, *Pimelodus maculatus*, *Rineloricaria lanceolata*, *Glanidium botocudo*, *Loricaria coximensis*, *Hypostomus* sp., *Lophiosilurus alexandri*), collected in 8 locations distributed throughout the DRB, in two different periods (rainy and dry seasons of 2019). About 15 fish were collected point each sampling site, weighed, sacrificed and their livers were removed and fixed. Slides prepared with 5 µm thick sections and stained in Hematoxylin/Eosin were randomly analyzed by optical microscopy, following standardized criteria to identify and quantify histopathological changes. Such changes were classified according to their degree of reversibility. The data obtained were organized to perform the D'Agostino Pearson

normality test and the Kruskal-Wallis test. In the rainy season there was a greater inconsistency in the histopathological responses, which can be explained by the greater diversity of species captured. In the dry period, the histopathological responses were more constant, with high rates of melanomacrophage centers, leukocyte infiltration and necrosis. In general, the rates of histopathological alterations were low, but the more severe alterations such as necrosis were located in the upper Doce river, where the contamination is mainly related with metals. In the mid and lower Doce river, a high amount of alterations related to the immune system of individuals was observed.

Keywords: histology, catfish, Mariana disaster, ecotoxicology, aquatic pollution

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso necessário para a sobrevivência dos seres vivos, sendo essencial para a manutenção das condições fisiológicas normais em todos os organismos, assim como para o funcionamento dos ecossistemas. O Brasil pode ser considerado um país privilegiado devido à riqueza de recursos hídricos que apresenta, porém, ao mesmo tempo, sofre com a sua escassez em alguns locais devido à sua distribuição desigual entre regiões e o uso inadequado (ANA, 2019; Borsoi e Torres, 1997). Além da alta demanda pelo consumo deste recurso natural devido ao crescimento populacional, há uma degradação crescente da sua qualidade devido aos processos de contaminação (ABC, 2014).

1.1 Bacia do rio Doce

O rio Doce representa um corpo hídrico nacional de grande importância socioeconômica e ambiental. Com seus 853 km de extensão, ele passa por dois estados brasileiros localizados no sudeste do país, Minas gerais (MG) e Espírito Santo (ES). Sua bacia hidrográfica de mais de 83 mil km^2 de área é responsável pelo abastecimento público de aproximadamente 3.6 milhões de habitantes (ANA, 2015). A bacia é dividida em três trechos, alto, médio e baixo rio Doce, sendo os dois primeiros localizados em MG. A nascente do rio Doce está localizada entre os municípios de Ponte Nova e Rio Doce (junção dos rios Piranga e Carmo). Já o baixo rio Doce localiza-se no ES, com a foz situando-se no município de Linhares (ES), na altura da praia de Regência, litoral norte do estado.

Ao longo do percurso do rio são observadas diferentes atividades antrópicas responsáveis por causar diversos impactos ambientais, como os processos de assoreamento e modificação do seu curso natural pela construção de usinas hidrelétricas

e a contaminação da água proveniente dos resíduos da mineração, efluentes domésticos e industriais e o aporte de insumos agrícolas (Veado et al., 2009). Porém, a fonte de poluição que mais se destaca na região, ou pelo menos aquela mais estudada até o presente momento, é a atividade da mineração, responsável por ter introduzido milhares de toneladas de metais nos corpos hídricos nos últimos 300 anos (Borba et al., 2003; Rodrigues et al., 2014).

O quadro de contaminação crônica, devido ao impacto histórico da mineração nas proximidades da bacia do rio Doce, foi agravado após o rompimento da barragem de Fundão, localizada em Mariana (MG), no dia 05 de novembro de 2015. Este evento foi considerado como o pior desastre ambiental na história do Brasil, afetando drasticamente a geomorfologia do rio Doce, assim como sua fauna e flora (ANA, 2015; IBAMA, 2015). O desastre recebeu a classificação de Desastre de Nível IV (desastre de muito grande porte) pelo Ibama em seu laudo técnico preliminar, de novembro de 2015, logo após a tragédia ter ocorrido, devido às suas características destrutivas em seus diversos âmbitos. O fatídico acontecimento começou a partir do rompimento da barragem, com a introdução de aproximadamente >50 milhões de m^3 do rejeito de minério de ferro nos rios Gualaxo do Norte e do Carmo, se alastrando pelo rio Doce até a sua foz, localizada no litoral do Espírito Santo, se espalhando pelo oceano. Antes da onda de lama alcançar o rio Doce, ela foi retida parcialmente nas barragens de Santarém e Candonga (UHE Risoleta Neves), porém os resíduos seguiram mais de 600 km até atingir a sua foz, afetando áreas de Preservação Permanente e Unidades de Conservação, além de terem causado grande prejuízo socioeconômico para as populações de 40 cidades afetadas diretamente pelos impactos, por serem localizadas nas proximidades do rio e/ou terem sido impossibilitadas de exercer a pesca ou utilizar suas águas como lazer ou outros usos, como irrigação. Também houve a perda de 19

vidas humanas durante o desastre, além das incontáveis espécies terrestres ou aquáticas que foram destruídas (Johas, 2017).

Segundo o laudo técnico do Ibama, o rejeito de mineração depositado em Fundão foi classificado como não perigoso e inerte pela Norma Técnica NBR 10.004, mas ainda assim foi responsável pela mortandade massiva da biodiversidade aquática (IBAMA, 2015; Lopes, 2016). Segundo Vieira (2009), o número total de espécies identificadas da ictiofauna antes do desastre era de aproximadamente 80, porém após o desastre ambiental, esse dado inconclusivo tornou-se ainda mais duvidoso, gerando enormes incertezas sobre os números atuais de espécies da ictiofauna local e a perda da sua biodiversidade.

1.2 Poluentes orgânicos e inorgânicos

De acordo com estudos preliminares, mesmo antes do desastre ocorrer, a bacia do rio Doce já era considerada como a mais degradada de Minas Gerais , apresentando um quadro de contaminação crônica tanto pelas atividades mineradoras como pelo esgoto lançado sem o devido tratamento (Rhodes et al., 2018). Considerando a intensa exploração dos minérios de ferro e de ouro na região do quadrilátero ferrífero no alto rio Doce, alguns dos principais poluentes detectados tanto na água como no sedimento do rio Doce são os metais essenciais, como o ferro (Fe) e manganês (Mn) e os não-essenciais, como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), e o metalóide arsênio (As) (Santolin et al., 2015; Vasconcelos et al., 2011). Metais traços não essenciais são caracterizados pelo maior potencial tóxico e por ocorrerem na natureza em menores concentrações e, quando em excesso causam grande desequilíbrio no ecossistema (Dias, 2018).

De acordo com Dias (2018), vários metais foram detectados pelo Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM, 2018) em diversos pontos ao longo de toda a

extensão do rio Doce, entre a data do desastre e 2017 (3 amostragens, uma por ano). Seus dados mostraram que logo após o rompimento da barragem, foi observada uma elevada concentração de metais (Quadro 1), como Fe, Mn e alumínio (Al) superando de dezenas a centenas de vezes os limites estabelecidos pela legislação brasileira (Conama, 2005). Com o passar do tempo, essas concentrações foram diminuindo até chegarem próximos dos níveis presentes antes do evento. Mesmo com a redução das concentrações, os valores de alguns elementos ainda se mostraram acima do aceitável para os 4 trechos analisados após 2 anos do acidente, como o Al, Fe, Mn e Pb. Estes dados evidenciam a condição de poluição existente da bacia, com a persistência destes metais desde antes mesmo do evento. Apesar da ocorrência dos metais ao longo de toda a extensão do Rio Doce, as maiores concentrações detectadas no trecho do alto rio Doce (Carvalho, 2017), sugerem um gradiente de contaminação por estes elementos, com seus níveis sendo reduzidos à medida que se aproximam da sua foz (RENOVA, 2019). Apesar disso, um estudo feito por Duarte et al. (2021), no baixo rio Doce em um momento pré (2013) e pós (2016) desastre, mostrou que os níveis de Cádmio (Cd) aumentaram significativamente após o rompimento da barragem.

Quadro 1 – Concentrações máximas registradas dos metais detectados em diferentes localidades do Rio Doce entre novembro de 2015 e dezembro de 2017. Adaptado de Dias (2018).

	1º trecho – Afluente do rio Doce						2º trecho – Rio Doce a montante de Candonga						Limite
	Antes	Nov.15-Mar.16	Abr.16-Set.16	Out.16-Mar17	Abr.17-Set.17	Out.17-Dez.17	Antes	Nov.15-Mar.16	Abr.16-Set.16	Out.16-Mar17	Abr.17-Set.17	Out.17-Dez.17	
Ar	0.0393	0.0036	<0.001	0.0044	0.0030	0.0065	0.0244	0.0244	0.0013	0.0032	0.0012	0.0026	0.01
Al	0.2090	1.0350	0.1060	0.1410	0.0690	0.1610	0.1710	2.390	0.1010	0.2010	0.0470	0.1280	0.1
Cd	0.0005	0.0008	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.001
Pb	0.0136	0.4460	0.0134	0.0134	<0.0005	0.0112	0.0139	0.0563	<0.005	<0.0068	<0.005	0.0134	0.01
Fe	0.2790	2.6200	0.8060	0.3920	0.1432	0.3170	0.5380	6.7580	0.6930	0.6930	0.1479	0.2710	0.3
Mn	1.6546	103.800	0.7240	2.2140	0.1150	2.7230	1.5200	15.010	0.1650	1.1210	0.0505	2.3160	0.1
Hg	0.2000	0.8890	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	0.2000	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	0.2
	3º trecho – Candonga-Baguari						4º trecho – Governador Valadares a Aimorés						Limite
	Antes	Nov.15-Mar.16	Abr.16-Set.16	Out.16-Mar17	Abr.17-Set.17	Out.17-Dez.17	Antes	Nov.15-Mar.16	Abr.16-Set.16	Out.16-Mar17	Abr.17-Set.17	Out.17-Dez.17	
Ar	0.0280	0.0974	0.0013	0.0030	0.0015	0.0030	0.0073	0.0363	<0.001	0.0021	<0.001	0.0037	0.01
Al	0.3040	32.200	0.2400	0.2570	0.2710	1.5160	3.1180	10.550	0.1320	0.4470	0.9290	0.2950	0.1
Cd	0.0015	0.0158	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0012	0.0346	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.001
Pb	0.0480	1.650	<0.005	0.0117	<0.005	0.0375	0.0670	0.4420	<0.005	0.0306	<0.005	0.0678	0.01
Fe	0.5100	32.260	2.0790	0.5630	0.3130	1.2410	2.0700	8.6150	0.2870	0.5460	0.5430	0.3020	0.3
Mn	1.2050	936.000	0.9950	0.9380	0.1420	0.0993	0.6740	67.200	0.1045	0.6800	0.0600	0.9200	0.1
Hg	0.2000	0.2390	0.2390	<0.20	<0.20	<0.20	0.2500	0.5290	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	0.2

Além dos metais provenientes da mineração, outras fontes de poluição como os efluentes domésticos e industriais, assim como as atividades agrícolas, são responsáveis por introduzir uma carga significativa de compostos orgânicos no rio Doce. Ao contrário dos metais, poucos estudos investigaram a ocorrência e distribuição de poluentes orgânicos ao longo da bacia. A partir do trecho do médio rio Doce, ocorrem atividades industriais siderúrgicas e de celulose, as quais são potenciais fontes de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) para os corpos hídricos. Essas substâncias despertam maior interesse na comunidade científica e entre as autoridades públicas, devido aos seus potenciais efeitos adversos, entre eles a mutagênese e a carcinogênese (WHO, 2000; Lima, 2008). Os HPA são compostos orgânicos que possuem dois ou mais anéis aromáticos e podem ser formados por reações, como a combustão incompleta em fenômenos naturais ou por ações antropogênicas. Podem ser liberados na atmosfera a partir da combustão incompleta de combustíveis fósseis, madeira e plásticos, e devido às suas propriedades hidrofóbicas se depositam no sedimento ou permanecem associados à matéria orgânica, podendo ser também bioacumulados nos organismos expostos (Lima, 2008) e causar hepatotoxicidade (AU, 1999; Wills, 2010). Em relação aos HPA, um estudo demonstrou sua ocorrência na região do médio rio Doce, na cidade de Ipatinga, onde há intensa atividade industrial siderúrgica (Lima, 2008). De acordo com o estudo, HPA de maiores massas molares (4 a 6 anéis) e de potencial tóxico, como o benzo[a]pireno, foram detectados na água em concentrações acima dos limites estabelecidos pela legislação (99 mg/L).

Outros poluentes que podem ser encontrados no rio Doce são os contaminantes emergentes provenientes dos efluentes domésticos, como os hormônios e fármacos, os quais também podem ser introduzidos através da agropecuária (Ongley, 1996;

Fontenele, 2010). Essas substâncias, quando absorvidas pelos animais ou pelo ser humano, podem interferir no funcionamento do sistema endócrino e afetar os processos de reprodução, crescimento, comportamento alimentar e diferenciação sexual (Diamanti-Kandarakis, 2009; WHO, 2012), os quais também dependem do funcionamento adequado do fígado, por exemplo na vitelogênese. É provável que estas substâncias estejam presentes a partir do médio rio Doce devido à maior densidade populacional e ao tratamento inadequado do esgoto doméstico nas cidades ribeirinhas.

No baixo rio Doce, além da ocorrência de cidades de médio porte, a atividade agrícola representa uma fonte significativa de poluição difusa, sendo, portanto, uma região onde são introduzidos agrotóxicos e outros produtos agrícolas. Um estudo realizado em um afluente do baixo rio Doce, identificou a presença de 24 pesticidas na água, pertencentes aos organoclorados, organofosforados, triazoles, carbamatos e inseticidas piretróides (Soares et al., 2013). Alguns dos principais inseticidas relacionados à poluição dos ambientes aquáticos são os carbamatos (alta atividade inseticida, baixa toxicidade em longo prazo, baixa ação residual, menos persistentes e mais biodegradáveis), organoclorados (alta estabilidade e persistência), organofosforados (instáveis) e piretróides (substituem organofosforados e possuem menor risco de contaminação) (Da Silva, 2013).

Ambos os poluentes orgânicos e inorgânicos podem prejudicar a ictiofauna do rio Doce através de diversos mecanismos, entre eles a lesão de órgãos-alvo como o fígado (Myers, 1991; Stentiford et al, 2003). O fígado é um órgão de extrema importância fisiológica por desempenhar diversas funções importantes no metabolismo das substâncias como: digestão, reprodução, detoxificação, catabolismo de nitrogênio, defesa imune, armazenamento de ferro, lipídeos, carboidratos e vitamina A e hematopoese. Como é um órgão de extrema importância metabólica, pode sofrer com

diversos estressores como os poluentes (Bruslé e Anadon, 1996), os quais podem causar lesões como as necroses, vacuolização citoplasmática, alterações morfológicas nucleares e infiltrações leucocitárias (Weber et al., 2020). Uma estratégia eficiente para avaliar esses potenciais efeitos prejudiciais nos peixes é através do uso de biomarcadores.

1.3 Biomarcadores

Biomarcadores representam respostas biológicas em menores níveis de organização biológica (Figura 1), capazes de refletir a interação entre um sistema biológico e o agente estressor químico (Lins, 2010). A resposta da interação a ser mensurada, pode se iniciar no nível molecular, prosseguindo para o celular, tecidual, órgão e organismo, variando de acordo com a intensidade e frequência da exposição. Neste caso, a utilização de um biomarcador de nível intermediário (tecidual), como a avaliação das lesões causadas em um conjunto de células de um órgão-alvo, representa um biomarcador de toxicidade crônica mais efetivo ao demonstrar de forma objetiva o grau de comprometimento de diferentes tecidos e órgãos (Amorim, 2003; Van Der Oost, 2003, apud Van Gastel and Van Brummelen, 1994). Além disso, é importante considerar espécies de nichos tróficos distintos, uma vez que seus hábitos alimentares e habitats podem influenciar diretamente nas vias de exposição aos poluentes.

Neste sentido, os peixes representam bons modelos animais para os estudos de ecotoxicologia, pois estão em contato direto com os poluentes presentes no ambiente aquático e, podem responder de forma adequada à presença desses contaminantes (Van Der Oost, 2003). Estes organismos apresentam grande importância ecológica e socioeconômica devido à sua ampla biodiversidade, por ocuparem diferentes níveis tróficos em um ecossistema, especialmente os superiores e, também pela sua alta

comercialização e consumo, sendo necessária uma avaliação adequada dos riscos de exposição tanto destes animais como dos seres humanos.

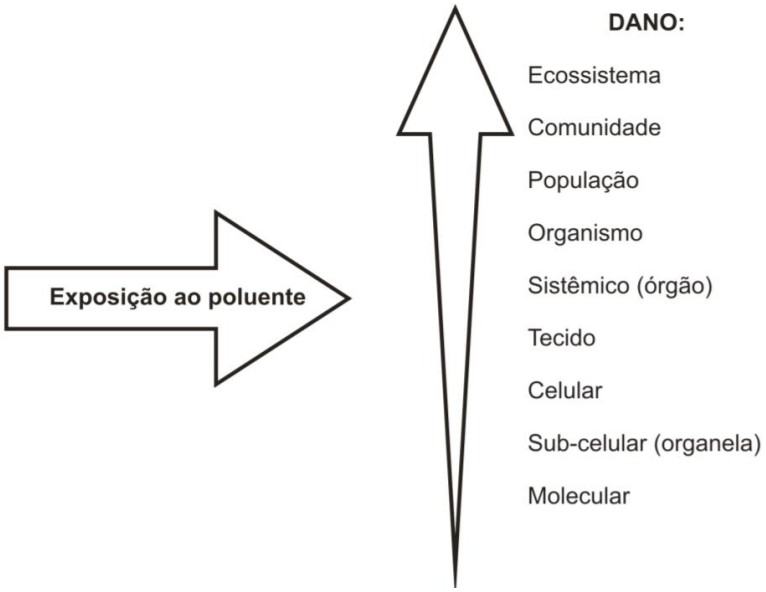

Figura 1 - Representação esquemática da ordem sequencial das respostas dos diferentes níveis de organização biológica dentro de um sistema biológico desencadeadas após a exposição ao poluente. Fonte: Schiavini et al. (2011).

Sendo assim, espécies de peixes que vivem em contato com o sedimento, como os bagres e cascudos, representam organismos adequados para avaliar os efeitos dos poluentes presentes neste compartimento ambiental do rio Doce. Por serem onívoros, seus hábitos alimentares variam do consumo de peixes a detritos (Gomes et al., 2000; Guerini et al., 2014), além disso, por serem epibentônicos, podem estar expostos também aos metais solubilizados no fundo dos rios, o que poderia aumentar a possibilidade de exposição aos contaminantes (via dérmica, brânquias e ingestão). Os grupos de bagres e cascudos são bastante comuns e abundantes na bacia do rio Doce, com algumas espécies mais abundantes que as outras, o que facilita a captura destes grupos, mesmo que de espécies diferentes, ao longo do rio. Entre as espécies estão: *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), *Trachelyipterus atriatulus* (Steindachner, 1877), *Pimelodus maculatus* (Lacepède, 1803), *Rineloricaria lanceolata* (Günther, 1868), *Glanidium botocudo* (Sarmento-Soares & Martins-Pinheiro, 2013), *Loricaria*

coximensis (Rodriguez, Cavallaro & Thomas, 2012), *Hypostomus* sp., *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876).

Para avaliar a saúde destes peixes, a histopatologia do fígado pode ser um biomarcador eficiente, pois é uma abordagem capaz de demonstrar diferentes patogenias que potencialmente estão relacionadas aos contaminantes (Triebskorn, 2008; Van Dyk 2007), no caso, aqueles presentes na água e sedimento do rio Doce. Juntamente com outras respostas obtidas através de um estudo maior, realizado pela Dra. Flávia Yamamoto[1], os dados obtidos da histopatologia são essenciais para uma melhor compreensão dos efeitos nos peixes decorrentes da exposição aos poluentes presentes no Rio Doce.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo colaborar com o monitoramento da qualidade ambiental da bacia do rio Doce, 4 anos após o desastre da barragem de rejeitos de minérios em Mariana (MG). Para tanto, empregou-se como ferramenta o biomarcador histológico no fígado de peixes epibentônicos coletados em 8 diferentes pontos ao longo da bacia estudada, abrangendo dois períodos distintos de coletas (período chuvoso e seco), visando associar os efeitos adversos observados e os respectivos contaminantes predominantes em cada ponto, bem como a influência da pluviosidade nos locais.

[1] * Processo FAPESP 2016/15229-1

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi monitorar a qualidade ambiental da bacia do rio Doce através da avaliação dos efeitos hepatotóxicos revelados pela histopatologia do fígado de 8 espécies de bagres e cascudos (*Rhamdia quelen*, *Trachelyipterus atriatulus*, *Pimelodus maculatus*, *Rineloricaria lanceolata*, *Glanidium botocudo*, *Loricaria coximensis*, *Hypostomus* sp., *Lophiosilurus alexandri*) coletadas ao longo do rio e em dois períodos do ano, 4 anos após o rompimento da barragem do Fundão, em Mariana (MG).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a morfologia geral do fígado de bagres e cascudos, coletados nos meses de janeiro e fevereiro (período chuvoso) e de julho e agosto (período seco) de 2019 em oito localidades do rio Doce;

- Identificar e classificar as alterações histopatológicas de cada indivíduo coletado, de acordo com a sua ocorrência e gravidade segundo o índice de Bernet et al. (1999).

- Relacionar as alterações histopatológicas encontradas com os contaminantes predominantes em cada local ao longo do rio Doce, comparando os locais entre si e com o local de referência quanto à poluição

- Comparar os resultados obtidos entre os dois períodos de coleta (período chuvoso e seco), visando associar a influência da pluviosidade sobre a ocorrência e severidade dos efeitos hepatotóxicos devido a possibilidade de ressuspensão de contaminantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Os locais de coleta foram definidos de acordo com as distintas fontes de poluição presentes ao longo da bacia, assim como as distâncias físicas equidistantes entre os pontos (2 a 3 pontos para cada trecho do rio), e os dados já disponíveis na literatura.

Os dois primeiros pontos no alto rio Doce, Gualaxo do Norte (ponto 1) e a barragem de Candonga (ponto 2) em Rio Doce, são os mais próximos do local onde houve o rompimento da barragem e, estão mais sujeitos ao impacto da mineração (Figura 2). A partir do médio rio Doce, em Naque (ponto 3) e Governador Valadares (ponto 5), encontra-se o despejo de efluentes domésticos e industriais sem o tratamento adequado, representando prováveis fontes de contaminantes orgânicos, nutrientes e alguns metais. Já os últimos três pontos localizados no baixo rio Doce (Aimorés, Colatina e Linhares, respectivamente pontos 6, 7 e 8) no Espírito Santo, estão mais próximos às áreas agrícolas, e, portanto, podem indicar uma contaminação adicional por pesticidas. O ponto referência (ponto 4) foi localizado no rio Corrente, um dos afluentes do rio Doce, e foi escolhido considerando estar fora da influência do desastre, embora fazendo parta da bacia do rio Doce.

O clima local está dividido em duas épocas: uma chuvosa e a outra seca. Estas diferenças podem ser observadas pelas influências topográficas e de sistemas frontais, mostrando que, durante o verão, ocorrem mais chuvas do que durante o inverno (Cupolillo, 2008). As chuvas também ocorrem de maneiras distintas em cada período, sendo mais frequente no interior da bacia durante o período chuvoso e mais próximo do litoral no período de seca (Cupolillo, 2008; RENOVA, 2019). Por isso, foram realizadas

duas coletas, uma durante o período chuvoso (janeiro e fevereiro) e outra durante o período seco (julho e agosto), para posterior comparação dos resultados em relação ao período do ano.

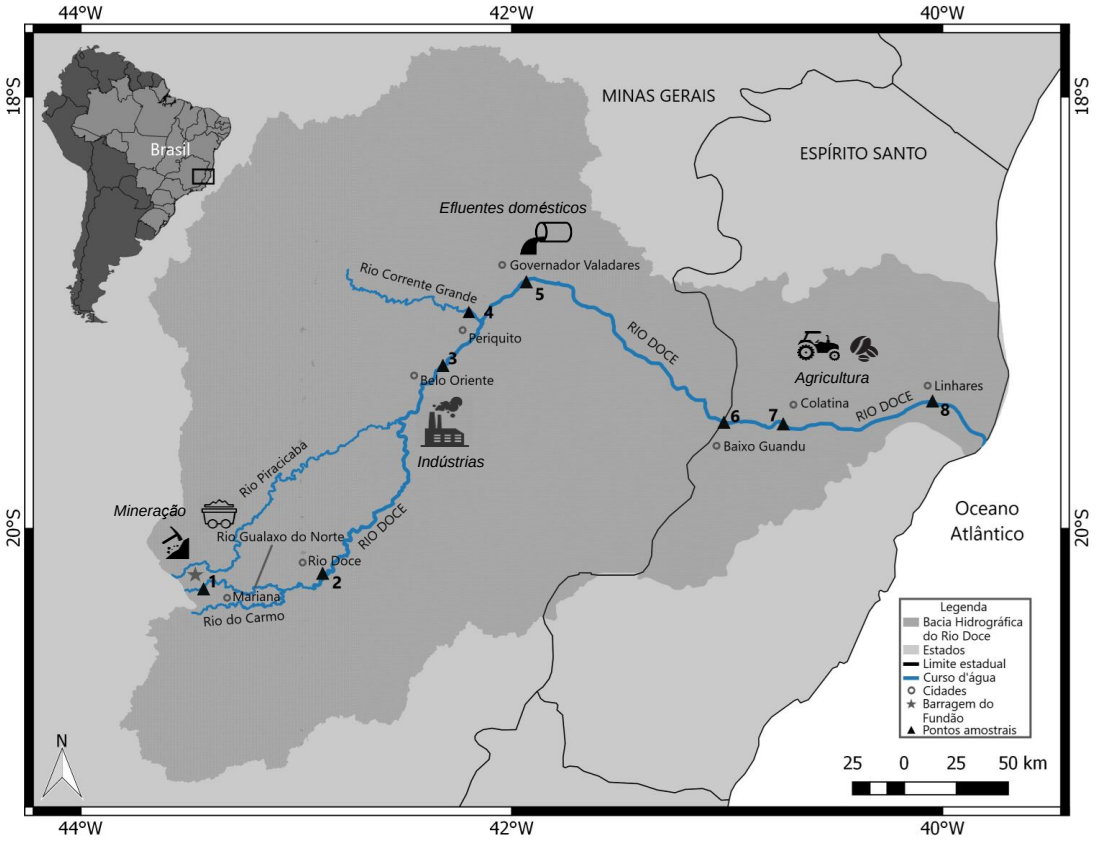

Figura 2 - Mapa do Rio Doce com os 8 pontos de amostragem dos peixes, água e sedimento, e as respectivas atividades antrópicas desenvolvidas ao longo da Bacia do Rio Doce. A Região do Alto Rio Doce (Pontos 1 e 2) sofre maior impacto da atividade de mineração, enquanto o Médio (pontos 3 e 5) e o Baixo Rio Doce (pontos 6, 7 e 8) estão mais sujeitos às atividades industriais e agricultura, respectivamente. 1 – Gualaxo do Norte (20°16'44.9"S 43°25'50.2"W). 2 – Candonga (20°12'24.1"S 42°52'39.7"W). 3 – Naque (19°14'37.5"S 42°19'09.1"W). 4 – Rio Corrente (Referência) (19°01'31.0"S 42°09'37.3"W). 5 – Governador Valadares (18°51'22.0"S 41°55'49.5"W). 6 – Aimorés (19°30'25.0"S 41°00'53.5"W). 7 – Colatina (19°30'51.8"S 40°44'21.7"W). 8 – Linhares (19°24'30.2"S 40°02'47.4"W).

3.2 Coletas

A coleta dos peixes ao longo do rio Doce foi feita durante os meses de janeiro e fevereiro (época chuvosa) e julho e agosto (época seca) de 2019, com o auxílio de pescadores da região, através de redes de emalhar, armadilhas do tipo covo, tarrafas e linhas e anzol. Para cada coleta foi feito um esforço amostral semelhante, permanecendo-se até 2 dias para a obtenção dos peixes em número suficiente.

Considerando a inviabilidade de captura da quantidade amostral suficiente de uma mesma espécie, foram coletadas diferentes espécies de bagres e cascudos, que ocupam o mesmo nicho ecológico e, portanto, que possivelmente estão em exposição similar aos contaminantes, o que torna possível a comparação entre estas espécies para os objetivos deste estudo. A Tabela 1 resume a quantidade de animais capturados ao longo da bacia do rio Doce.

Tabela 1. Quantidade de peixes coletados (n) ao longo da bacia do rio Doce em janeiro e fevereiro (período chuvoso) e julho e agosto (período seco) de 2019.

	Espécie	*Rhamdia quelen*	*Hypostomus* sp.	*Trachelyipterus striatulus*	*Pimelodus maculatus*	*Rineloricaria lanceolata*	*Glanidium botocudo*	*Lophiosilurus alexandri*		*Loricaria coximensis*	
	Nome popular	Jundiá	Cascudo	Cumbaca	Mandi	Cascudo-chicote	Cumbaquinha	Pacama	Bagre cinza	Cascudo-viola	**Total**
	Ponto de coleta										
Verão (período chuvoso)	Referência (Rio Corrente)	1	-	1	-	15	-	-	-	-	**17**
	1 (Gualaxo do Norte)	13	-	-	-	-	-	-	-	-	**13**
	2 (Candonga)	1	4	5	-	-	-	1			**11**
	3 (Nague)	-	6	1	7	-	-				**14**
	5 (Governador Valadares)	-	6	-	7	-	-				**13**
	6 (Aimorés)	-	-	12	3	-	2				**17**
	7 (Colatina)	-	-	2	11	-	2				**15**
	8 (Linhares)	-	-	-	8	-			3		**11**
Total		**15**	**16**	**21**	**36**	**15**	**4**	**1**	**3**	**0**	**111**
Inverno (período seco)	Referência (Rio Corrente)		5		13						**18**
	1 (Gualaxo do Norte)	9									**9**
	2 (Candonga)				2					7	**9**
	3 (Nague)				12					2	**14**
	5 (Governador Valadares)				10					5	**15**
	6 (Aimorés)		3		10					4	**17**
	7 (Colatina)				15					3	**18**
	8 (Linhares)				12						**12**
Total		**9**	**8**	**0**	**74**	**0**	**0**	**0**	**0**	**21**	**112**

Após a captura dos espécimes, todos foram transportados, em caixas térmicas sob aeração constante, até o local onde seria feita a coleta dos tecidos dos peixes, sendo sempre locais previamente higienizados e próximos dos locais de captura dos peixes. Os animais foram anestesiados com benzocaína 0,02% (p-aminobenzoato de etila em etanol PA a 200 mg/L) e em seguida foram medidos e pesados. Em seguida, foram sacrificados com secção vertebral, e dissecados com auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas para remoção dos fígados fixados em solução ALFAC (Álcool – 75%, Formol – 20% e Ácido Acético – 5%) por 16 horas, transferidos para álcool 70% e

conservados assim dentro de cassetes até o processamento histológico, realizado poucos meses depois da coleta.

3.3 Histologia

As amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de etanol, por imersão em soluções de álcool em diferentes concentrações por aproximadamente 1 hora em cada, começando a partir do álcool 70%, e em seguida 80%, 95%, 100% I, 100% II e 100% III. A desidratação é necessária para retirar a água dos tecidos, através da troca pelo álcool, para que a parafina possa penetrar no material, uma vez que esta tem caráter hidrofóbico (Caputo, 2010). Após a desidratação, os cassetes com as amostras permaneceram mergulhados em xilol I e xilol II, por cerca de 1 hora em cada solução, para diafanização (ou clarificação), processo no qual o álcool é substituído pelo xilol, o qual também apresenta caráter hidrofóbico, facilitando a inclusão do Paraplast Plus. As duas etapas anteriores foram realizadas num equipamento (Thermo) que realizava as trocas de substância automaticamente (Figura 3). Por fim, foi realizada a impregnação do Paraplast Plus em estado líquido (Sigma Aldrich), o qual foi derretido em uma máquina (Thermo) a 60ºC (Figura 4) para que o órgão fosse preservado em sua morfologia original e facilitar o corte do material (Figura 5).

Figura 3 - Máquina automática de inclusão. Os recipientes possuem as diferentes concentrações de álcool para a desidratação e posterior emblocamento.

Figura 4 - Equipamento que realiza o derretimento do Paraplast Plus e emblocamento o material.

Figura 5 - Cassetes com fígado e intestino emblocados em Paraplast Plus.

O corte do material foi realizado em um Micrótomo Leica RM 2145 manual (Figura 6) e com um aquecedor (Figura 7), gentilmente disponibilizados em uma parceria com o Laboratório de Toxicologia Celular (Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR), coordenado pelo professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. Antes de iniciar o corte do material, os blocos foram resfriados em um congelador para facilitar o processo de corte, que foram feitos com 5µm, após um desgaste do material utilizando cortes de 20µm até chegar no tecido. As lâminas foram umedecidas com solução de albumina para posicionar os cortes.

Figura 6 - Micrótomo Leica RM 2145 utilizado para realizar os cortes histológicos.

Figura 7 - Aquecedor utilizado para esquentar os cortes para que estiquem.

Com os cortes histológicos finalizados, foi feita a coloração das lâminas com o corante H.E. (Hematoxilina e Eosina). As soluções de álcool foram preparadas por meio de diluição do álcool absoluto. Para o cálculo dos volumes, foi utilizada a fórmula $C_1.V_1 = C_2.V_2$, onde C é concentração e V é volume. Primeiramente foi realizada a diluição

em 90% utilizando o volume final de 1 litro. Com a sobra desta primeira solução, foram feitas as demais diluições. Desta forma foram obtidos cerca de 400 ml de cada solução.

Com a bateria de coloração preparada, a coloração das lâminas foi iniciada, começando pela hidratação das lâminas utilizando 5 soluções para imersão: Xilol (6 minutos), álcool 100% (6 minutos), álcool 90% (3 minutos), álcool 80% (3 minutos) e álcool 70% (3 minutos). Essa hidratação é necessária pois os corantes utilizados são hidrofílicos e, portanto, é preciso que o material seja hidratado (Caputo, 2010). Após a fase de hidratação, as lâminas foram lavadas em imersão de água destilada por 2 minutos duas vezes. Terminando a lavagem, as lâminas foram imersas no primeiro corante, a Hematoxilina, que é uma base capaz de corar componentes ácidos do tecido em tons de roxo e azul, por 1 minuto e 30 segundos e assim que o tempo terminava, as lâminas foram colocadas em água corrente para lavagem por 10 minutos. O próximo passo foi outra lavagem por imersão de água destilada e então o material foi mergulhado no segundo corante, a Eosina, que, ao contrário da Hematoxilina, tem caráter ácido e é capaz de corar as partes básicas das células, por 5 minutos. A diferença de tempo entre as imersões nos corantes depende da concentração das soluções, e neste caso, a Eosina estava mais diluída do que a Hematoxilina e, por isso, as lâminas precisaram ficar mais tempo na Eosina. Após a Eosina, o material foi lavado novamente em água destilada da mesma maneira que as anteriores e então começou a fase de desidratação, que consistiu em outras 6 soluções crescentes de etanol e xilol: álcool 95% (3 minutos), álcool 100% I (3 minutos), álcool 100% II (3 minutos), álcool + xilol 1:1 (3 minutos), xilol I (3 minutos) e xilol II (3 minutos). Esta fase de desidratação é necessária, uma vez que o Entellan (substância utilizada para colar a lamínula na lâmina) é hidrofóbico e, portanto, para que funcione, é preciso que o material seja desidratado (Caputo, 2010). Logo após a desidratação, foi adicionado Entellan (Merck®) para o processo de montagem das

lâminas permanentes com o posicionamento da lamínula sobre os cortes. Após estes processos, as lâminas ficaram prontas para serem analisadas através do microscópio de luz. A Tabela 2 apresenta as etapas de emblocagem e coloração compiladas e resumidas.

Tabela 2 – Protocolos de emblocagem e colocação do processamento histológico empregados.

Etapa	Substância	Tempo
Emblocagem		
Fixação	ALFAC	16 horas
	Álcool 70% e refrigeração	Até momento de inclusão
Inclusão/Desidratação	Álcool 80%	1 hora
	Álcool 95%	1 hora
	Álcool 100% I	1 hora
	Álcool 100% II	1 hora
	Álcool 100% III	1 hora
Diafanizaão/Clarificação	Xilol I	1 hora
	Xilol II	1 hora
Impregnação	Paraplast Plus (Sigma)	60ºC
Coloração		
Hidratação	Xilol I	6 minutos
	Álcool 100%	6 minutos
	Álcool 90%	3 minutos
	Álcool 80%	3 minutos
	Álcool 70%	3 minutos
Corantes	Água destilada (2x)	2 minutos
	Hematoxilina	1 minuto e 30 segundos
	Água corrente de torneira	10 minutos
	Água destilada	2 minutos
	Eosina	5 minutos
	Água destilada (2x)	2 minutos
Desidratação	Álcool 95%	3 minutos
	Álcool 100% I	3 minutos
	Álcool 100% II	3 minutos
	Álcool + Xilol (1:1)	3 minutos
	Xilol I	3 minutos
	Xilol II	3 minutos

Com as lâminas prontas, foram utilizados um microscópio óptico Zeiss da UNESP IB/CLP (São Vicente) e um notebook pessoal para anotação em planilha das avaliações. Estas análises foram realizadas de acordo com Bernet et al. (1999), que

classifica cada alteração com um fator de importância (o quão grave a alteração é) considerando também a sua frequência no tecido (o quanto está presente).

$$Índice\ de\ Bernet = \Sigma\ (\ fator\ de\ impotância\ x\ frequência\ )$$

O fator de importância é dividido em: 1- Importância patológica mínima: lesão facilmente reversível quando a exposição ao irritante é cessada; 2- Importância patológica moderada: lesão reversível na maioria dos casos se o estressor é neutralizado; 3- Importância patológica severa: lesão geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão (Bernet et al., 1999; Yamamoto, 2016). Este fator de importância é atribuído a cada alteração de acordo com a gravidade da patologia, como por exemplo uma hemorragia, que normalmente pode ser neutralizada se o estressor for eliminado, recebe valor 1, e caso seja uma necrose, este que é uma lesão que não é reversível, recebe valor 3.

Já o grau de frequência é medido apenas em números pares de 2 a 8, sendo 2 pouco presente no tecido analisado e 8 muito presente. Ou seja, quando uma alteração foi observada, foi feita uma avaliação desta alteração pelo tecido onde era levado em conta a frequência em que aparecia pelo corte e o tamanho destas alterações. Caso fossem muito grandes ou frequentes, eram classificadas com valor 8 e caso fossem pequenas ou vistas poucas vezes, recebiam valor 2. A Tabela 3 apresenta cada alteração analisada com seus respectivos Fatores de Importância, assim como uma breve descrição da alteração.

Tabela 3 – Lista de alterações histopatológicas, com seus respectivos fatores de importância (Bernet et al., 1999) e breve descrição, encontradas na literatura e utilizadas para avaliação da histologia do fígado de peixes bagre do rio Doce, durante as campanhas de verão e inverno em 2019.

Alteração	Fator de Importância	Descrição
Congestão Vascular	1	Grande presença de eritrócitos nos

		sinusóides, bloqueio vascular[3]
Diferenciação Tecidual	1	Hepatócitos com formato diferente
Diltação dos Sinusóides	1	Sinusóides maiores que o normal
Hemorragia	1	Eritrócitos fora do sistema vascular[3]
Hipertrofia	1	Células de tamanho maior do que as demais do tecido[2]
Agregados de Melanomacrófagos	1	Podem ser de diversos tamanhos e sua coloração é amarelada[1]
Parasitas	1	Organismos macroscópicos, encapsulados ou "bolhas" em agregados de melanomacrófagos
Vacuolização	1	Acúmulo de gordura citoplasmática, núcleo "espremido" nas extremidades das células[3]
Alteração nuclear	2	Deformação no formato do núcleo[2]
Granuloma peritubular	2	Paredes de ductos biliares mais grossos
Granuloma perivascular	2	Fibrose perivascular, paredes dos vasos mais grossas
Hiperplasia	2	Aumento de quantidade de células, sem aumentar o volume das células[2]
Infiltração leucocitária	2	Agregado de linfócitos, encontrados próximos de vasos sanguíneos, granulomas e melanomacrófagos, podendo ter tamanhos variados e coloração azulada, pois o núcleo ocupa a maior parte da célula[1]
Necrose	3	Células desordenadas, limites de células se desfazendo, núcleos perdidos ou se desfazendo. Células que perdem suas funções[2]
Neoplasia	3	Proliferação anormal e descontrolada de células. Um tumor benigno apresenta uma camada de células envolvendo as células anormais e o maligno não, permitindo que se espalhe por todo o tecido ou outros órgãos[2]

([1]Fricke et al., 2012; [2]Bernet et al., 1999; [3]Peixoto, 2020).

3.4 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, os dados obtidos pela análise histológica foram organizados e analisados utilizando o aplicativo Excell e o GraphPad Software, onde foram realizados o testes estatísticos de normalidade D'Agostino Pearson, que avalia a normalidade entre os valores de cada ponto e os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$), visto que os resultados do teste de normalidade não apresentaram distribuição normal. A avaliação final foi feita com os resultados obtidos através das tabelas geradas e os dados químicos sobre a água e o sedimento do rio Doce.

4. RESULTADOS

As alterações histopatológicas encontradas nos fígados dos bagres estão listadas, classificadas e descritas na Tabela 3 e algumas delas exemplificadas em imagens (Figura 8), como as congestões vasculares, necrose, hemorragia, parasita e neoplasia. A Figura 9 mostra a histologia de um tecido hepático normal, encontrado em um indivíduo do ponto Referência, da espécie *Pimelodus maculatus* (mandi). O fígado apresenta uma histologia bem homogênea, apresentando hepatócitos, canais vasculares, células sanguíneas e células de defesa. A coloração H.E. facilita a visualização dos núcleos e leucócitos (cor mais azulada por terem um caráter mais ácido) e do citoplasma (cor mais rosada por ter um caráter básico).

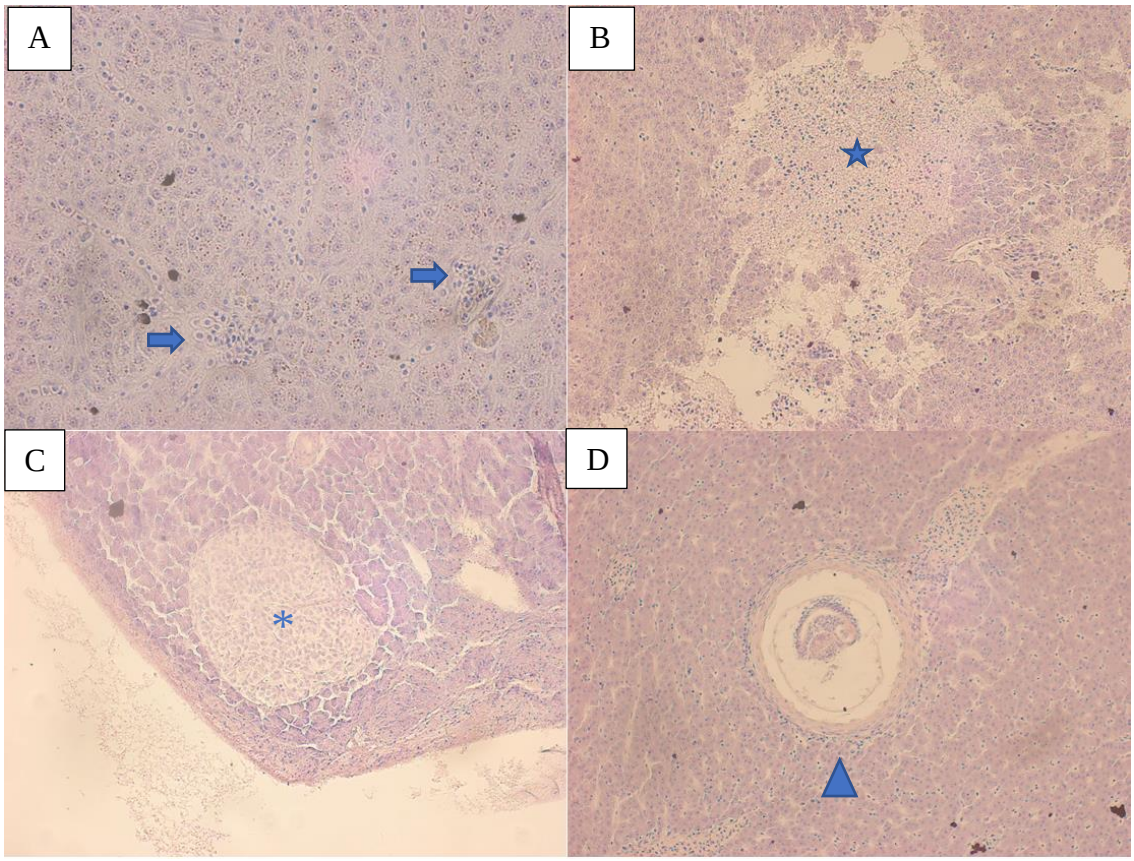

Figura 8 – Fotomicrografia de alterações histopatológicas do fígado de *Pimelodus maculatus*, mandis, coletados em julho e agosto de 2019 (inverno) ao longo da bacia do rio Doce. A – congestões vasculares, em aumento de 40x (setas). B – necrose com hemorragia, em aumento de 20x (estrela). C – neoplasia, em aumento de 20x (asterisco). D – parasita encapsulado, em aumento de 20x (triângulo).

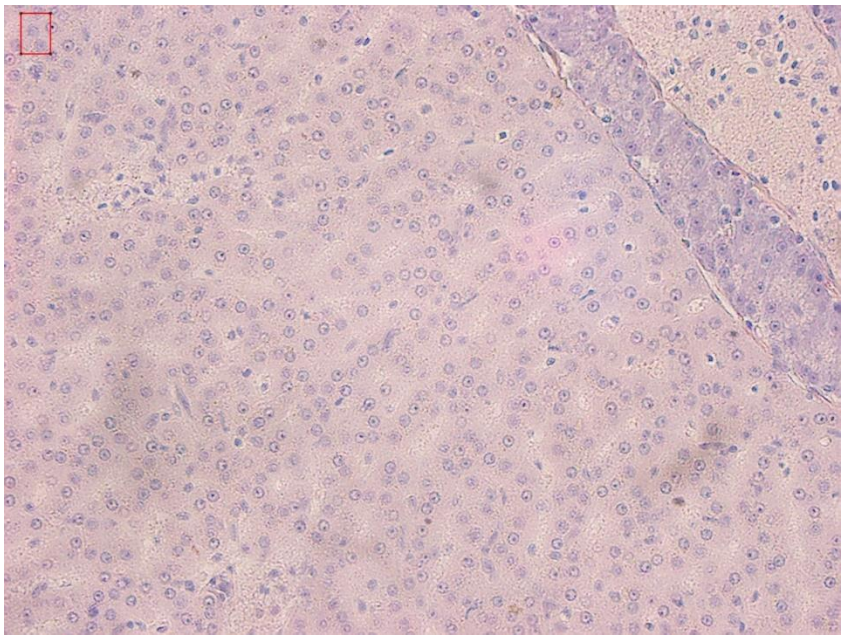

Figura 9 – Fotomicrografia de um tecido hepático de *Pimelodus maculatus*, mandis, coletados em julho e agosto de 2019 (inverno) ao longo da bacia do rio Doce. Aumento de 40x.

A Tabela 4 apresenta as porcentagens de alterações encontradas nos fígados dos indivíduos por ponto de coleta durante o período chuvoso. Neste período, uma alteração classificada com o fator de importância 1 foi encontrada com uma frequência maior ou igual a 50% em quase todos os pontos, com exceção do ponto Referência. Estas alterações foram: dilatação de sinusóides no ponto 1/GUA (76,92%), congestão vascular no ponto 2/CAN (63,63%), centros de melanomacrófagos nos pontos 3, 7 e 8/NAQ, COL e LIN (50%; 86,66% e 100% respectivamente) e vacuolização nos pontos 5 e 6/GOV e AIM (76,92% e 70,58% respectivamente).

Das alterações classificadas com o fator de importância 2, apenas infiltração leucocitária apresentou uma frequência maior do que 50% nos pontos 7 e 8/COL e LIN (73,33% e 72,72% respectivamente) e a não foram observadas hiperplasias em nenhum dos indivíduos coletados. Já em relação às alterações classificadas com o fator de importância 3, as alterações mais graves foram encontradas necrose em todos os pontos,

em especial no ponto 2 (CAN) com presença em 54,54% dos indivíduos; e neoplasia encontrada no ponto 3 (NAQ) com presença em 7,14% dos indivíduos.

Os indivíduos do ponto referência (4/REF) não apresentaram nenhuma alteração com frequência maior que 30%, apresentando 23,52% de centros de melanomacrófagos e 11,76% de necrose. Já os animais dos demais pontos de coleta apresentaram uma ou duas alterações que foram iguais ou excederam 50% de frequência. Os indivíduos dos pontos COL e LIN apresentaram alta porcentagem de centros de melanomacrófagos e infiltrações leucocitárias, diferente dos organismos obtidos nos demais pontos, indicando a presença de inflamação nestes indivíduos. A alteração mais frequente foi a presença de centros de melanomacrógafos, observada em 3 pontos com porcentagem igual ou acima de 50%.

Tabela 4- Porcentagens de alterações encontradas na histopatologia dos peixes bagres e cascudos coletados durante o período chuvoso (janeiro e fevereiro) ao longo da bacia do rio Doce. Em vermelho são os valores igual ou acima de 50% e em verde são os valores 0%.

	GUA	CAN	NAQ	REF	GOV	AIM	COL	LIN
Congestão Vascular	46,15%	63,63%	7,14%	11,76%	38,46%	47,05%	13,33%	9,09%
Diferenciação Tecidual	46,15%	18,18%	7,14%	0%	23,07%	5,88%	6,66%	18,18%
Dilatação Sinusóides	76,92%	27,27%	7,14%	5,88%	15,28%	0%	6,66%	0%
Hemorragia	46,15%	27,27%	14,28%	17,64%	15,38%	47,05%	20%	0%
Hipertrofia	0%	36,36%	14,28%	17,64%	23,07%	0%	13,33%	18,18%
Melanomacrófagos	23,07%	9,09%	50%	23,52%	15,38%	23,52%	86,66%	100%
Parasitas	0%	9,09%	14,28%	11,76%	0%	11,76%	46,66%	36,36%
Vacuolização	7,69%	18,18%	14,28%	11,76%	76,92%	70,58%	20%	18,18%
Alteração nuclear	7,69%	9,09%	7,14%	0%	15,38%	0%	0%	9,09%
Granuloma Perivascular	38,46%	45,45%	21,42%	11,76%	23,07%	29,415	6,66%	27,27%
Granuloma Peritubular	0%	9,09%	7,14%	5,88%	15,38%	0%	6,66%	0%
Hiperplasia	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Infiltração Leucocitária	30,76%	18,18%	42,85%	17,64%	23,07%	35,29%	73,33%	72,72%
Necrose	38,46%	54,54%	28,57%	11,76%	23,07%	41,17%	33,33%	27,27%
Neoplasia	0%	0%	7,14%	0%	0%	0%	0%	0%

Já durante no período de seca (Tabela 5), as alterações classificadas com o fator de importância 1 estiveram presentes em 50% ou mais indivíduos na maioria dos pontos, com exceção do ponto 2 (CAN). Estas alterações foram: dilatação de sinusóides no ponto 1/GUA (77,77%), centros de melanomacrófagos nos pontos 3, 4, 5, 6, 7 e 8/NAQ, REF, GOV, AIM, COL e LIN (87,14%; 72,22%; 66,66%; 64,70%; 88,88% e 100% respectivamente), Hipertrofia no ponto 6/AIM (52,94%) e parasitas no ponto 7/COL (61,11%).

Das alterações classificadas com o fator de importância 2, foi observada apenas infiltração leucocitária com frequência maior ou igual a 50%, nos pontos 3, 4, 5, 6 e 7/NAQ, REF, GOV, AIM, COL e LIN (64,28%; 72,22%; 66,66%; 64,70% e 77,77% respectivamente). Já em relação às alterações classificadas com o fator de importância 3, ou seja, as mais graves, foram encontradas tanto necroses quanto neoplasias em indivíduos de diversos pontos, sendo que apenas necrose apresentou frequência maior ou igual a 50% nos pontos 2, 3 e 5/CAN, NAQ e GOV (55,55%; 57,14% e 60% respectivamente). Neste período, as alterações mais frequentes foram a presença de centros de melanomacrófagos e infiltrações leucocitárias, indicando respostas inflamatórias na maioria dos pontos avaliados.

Tabela 5 – Porcentagens de alterações encontradas na histopatologia dos peixes bagres e cascudos, compiladas de todos os pontos coletados durante o período seco (julho e agosto). Em vermelho são os valores igual ou acima de 50% e em verde são os valores 0%.

	GUA	CAN	NAQ	REF	GOV	AIM	COL	LIN
Congestão Vascular	33,33%	22,22%	14,28%	5,55%	13,33%	17,64%	22,22%	0%
Diferenciação Tecidual	33,33%	11,11%	14,28%	0%	13,33%	5,88%	0%	0%
Dilatação Sinusóides	77,77%	33,33%	7,14%	5,55%	6,66%	5,88%	5,55%	0%
Hemorragia	0%	11,11%	7,14%	5,55%	13,33%	0%	16,66%	0%
Hipertrofia	0%	44,44%	21,42%	16,66%	33,33%	52,94%	16,66%	8,33%
Melanomacrófagos	22,22%	11,11%	87,14%	72,22%	66,66%	64,70%	88,88%	100%
Parasitas	0%	0%	28,57%	22,22%	26,66%	23,52%	61,11%	41,66%
Vacuolização	0%	22,22%	7,14%	0%	13,33%	29,41%	16,66%	0%

Alteração nuclear	0%	11,11%	28,57%	11,11%	26,66%	29,41%	11,11%	8,33%
Granuloma Perivascular	22,22%	22,22%	14,28%	5,55%	6,66%	5,88%	11,11%	8,33%
Granuloma Peritubular	0%	22,22%	14,28%	5,55%	6,66%	5,88%	16,66%	0%
Hiperplasia	0%	11,11%	0%	0%	0%	5,88%	0%	8,33%
Infiltração Leucocitária	33,33%	11,11%	64,28%	72,22%	66,66%	64,70%	77,77%	25%
Necrose	11,11%	55,55%	57,14	22,22%	60%	47,05%	27,77%	33,33%
Neoplasia	0%	11,11%	7,14%	0%	0%	5,88%	5,55%	8,33%

Os testes estatísticos realizados com os índices de Bernet et al. (1999) mostraram que em ambos os períodos, os valores não se comportam de maneira normal, através do teste D'Agostino & Pearson. Com isso foi feito o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e seu pós-teste, onde foi evidenciado quais os pontos mais divergentes entre eles (Figura 11 e 12).

As Figuras 11 e 12 mostram as médias dos índices de Bernet et al. (1999) calculados para os períodos chuvoso e seco, respectivamente. No período chuvoso (Figura 11), os animais coletados nos pontos 2 e 7 (CAN e COL, $p = 0.3933$ e 0.2567 respectivamente) apresentaram índices significativamente maiores do que aqueles do ponto REF ($p = 0.0003$), enquanto no inverno (Figura 12) os peixes do ponto 1 (GUA, $p = 0.4470$) foram significativamente menos afetados que os do ponto REF ($p = 0.0985$) e aqueles do ponto 5 (GOV) apresentaram alterações significativamente maiores ($p = 0.4218$).

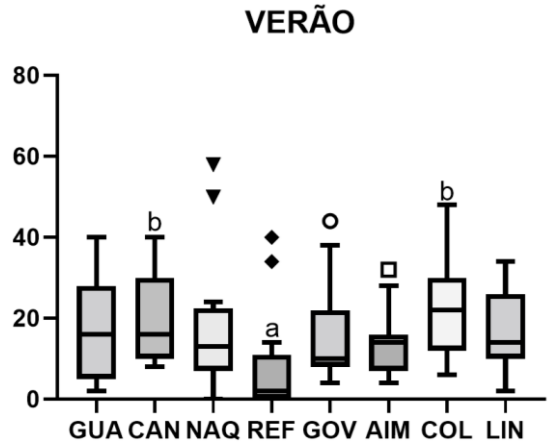

Figura 11 – Comparação da somatória dos índices de Bernet et al. (1999) entre os pontos de coleta do período chuvoso (janeiro e fevereiro de 2019). Em (a) é possível observar que REF é o ponto com os índices mais baixos da campanha, enquanto (b) CAN e COL são os pontos mais altos da campanha.

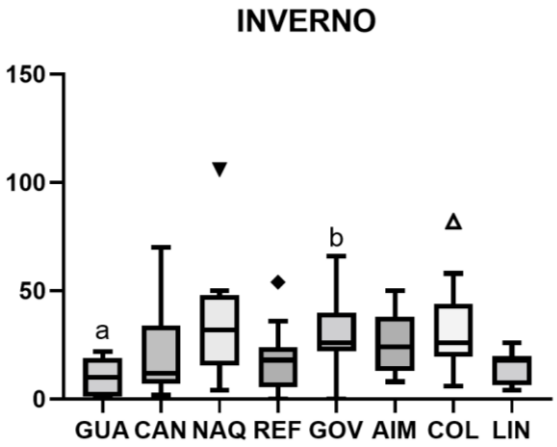

Figura 12 - Gráfico de comparação da somatória dos índices de Bernet et al. (1999) entre os pontos de coleta do período seco (julho e agosto de 2019). Em (a) em GUA mostra que o ponto possui diferença significativa com o ponto GOV indicados pelo (b) e que GUA é o ponto com menores índices, enquanto GOV é o que possui os maiores índices.

4.1 Análises químicas e Dados pluviométricos

Os dados de pluviosidade média durante o período mais chuvoso (janeiro e fevereiro) e seco (julho e agosto) foram selecionadas dos Boletins Semanais da Qualidade de Água realizados em 2019 pela Fundação RENOVA. O Quadro 2 em anexo, foi adaptado dos boletins pela média de cada região da bacia do rio Doce e pela média do mês para cada região, no período chuvoso. Os valores de precipitação no verão deste ano foram abaixo da média para as regiões, que costumam ser mais

chuvosas. A média de precipitação em janeiro foi mais baixa do que em fevereiro. Já para o período de seca (julho e agosto), os dados foram adaptados no Quadro 3 em anexo. A precipitação média nos meses relativos à estiagem foi mais baixa que durante os meses chuvosos, sendo que o índices de pluviosidade foram mais baixos no médio rio Doce e mais altos no alto rio Doce.

Quanto às análises químicas, os dados foram gerados pelo projeto de pós-doutorado da Dra. Flávia Yoshie Yamamoto (Processo FAPESP 2016/15229-1), e compartilhados com esta pesquisa, visando permitir o estabelecimento de associações entre os efeitos histopatológicos nos peixes e a contaminação química de aguas e sedimentos do rio Doce.

Para os poluentes inorgânicos dissolvidos na água, foram feitas as medições de concentração de diversos elementos, com destaque para o Alumínio, Ferro, Manganês, Cobre, Níquel e Chumbo, que foram frequentes com concentrações mais elevadas. No Quadro 4, é possível observar as concentrações de cada um dos metais, sendo que os valores marcados em vermelho estiveram acima do limite legal permitido. O Alumínio e o Ferro, durante o período chuvoso, quase sempre apresentaram valores muito acima do limite, principalmente nos pontos do baixo rio Doce (pontos 6/AIM, 7/COL e 8/LIN), no caso do Alumínio, e REF (Rio Corrente), AIM e COL (pontos 6 e 7 respectivamente), no caso do Ferro. No período seco as concentrações de metais na água estavam mais baixas devido aos menores índices pluviométricos, que não favorecem a remobilização dos elementos para a coluna d'água.

Os poluentes orgânicos (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA) dissolvidos na água também foram analisados (Quadro 5). A maioria dos HPA testados não foi encontrada, mas 7 deles foram detectados, sendo o Pireno e o Fluoranteno os mais frequentes (acima de 0.5 $\mu g.L^{-1}$) nos pontos 5 e 6 (GOV e AIM) (apenas Pireno)

durante o período seco. Já o Naftaleno esteve presente em mais pontos, em GUA, CAN, AIM, COL e LIN (pontos 1, 2, 6, 7 e 8 respectivamente), durante os dois períodos, com concentrações variando entre 0.01 ~ 0.03 $\mu g.L^{-1}$. NAQ e REF (pontos 3 e 4 respectivamente) não apresentaram concentrações detectáveis de HPA.

Os poluentes inorgânicos que tiveram presença no sedimento de todos os pontos e em grande quantidade, tanto no período chuvoso quanto no seco, foram o alumínio e o ferro. O manganês esteve presente no ponto 1 (GUA) durante o período chuvoso e nos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 (GUA, CAN, NAQ, REF e GOV respectivamente). Os demais metais estiveram significativamente presentes em alguns poucos pontos, como pode ser observado na Quadro 6.

Todos os poluentes orgânicos (HPA) testados nas amostras de sedimento de ambas as campanhas foram detectados, mas a maioria deles estiveram em concentrações menores que os limites recomendados (Quadro 7). Apenas o Benzo[a]Pireno apresentou valores acimado limite, no ponto 3 (NAQ) durante o período chuvoso e no ponto 7 (COL) durante o período seco. Os pontos que apresentaram níveis mais altos de HPA foram o 3, 5, 7 e 8 (NAQ, GOV, COL e LIN respectivamente) em ambos os períodos do ano e os pontos mais poluídos foram o 3 (NAQ) durante o período chuvoso e o 7 (COL) durante o período de seca.

No geral, ambos os períodos do ano de 2019 apresentaram baixos índices pluviométricos, o que estaria relacionado à menor contaminação da água do que do sedimento, pela falta de ressuspensão dos poluentes depositados, mas o verão ainda apresentou maiores índices do que o inverno. Mesmo assim, o baixo rio Doce, durante o período chuvoso, apresentou maiores índices de contaminação por metais e os níveis de HPA em ambos os períodos foram baixos na maioria dos pontos. Já os sedimentos, de

ambas as estações, do alto e médio rio Doce estiveram mais contaminados com metais e o médio e baixo rio Doce apresentaram maiores níveis de HPA.

5. DISCUSSÃO

No geral, os bagres e cascudos em geral apresentaram alterações histopatológicas moderadas, sendo que os maiores índices de Bernet (1999) atingiram 60 no verão e 100 no inverno. É possível que esses índices tenham sido relativamente baixos e inconstantes durante os meses de janeiro e fevereiro por ter sido utilizado uma grande variedade de espécies, mesmo sendo a época mais chuvosa. Secada espécie estivesse reagindo de maneira diferente das demais espécies, poderia ser induzida uma certa variabilidade nos resultados obtidos. Além disso, a baixa taxa de precipitação acumulada durante o verão de 2019, embora bem mais alta que no inverno, pode ter reduzido a exposição dos peixes aos poluentes. Já em julho e agosto, houve uma maior constância nas espécies coletadas ao longo dos pontos, o que pode ter gerado resultados mais consistentes, como a presença de centros de melanomacrófagos alterados e infiltrações leucocitárias em seis e cinco, respectivamente, dos oito pontos analisados. Ambas as alterações são parte do sistema imune e mostram que os indivíduos estão com células defensoras reagindo a antígenos externos.

Outra função dos centros de melanomacrófagos é a capacidade de fagocitar eritrócitos (Steinel, 2017; Viana, 2021), o que pode explicar alguns centros de melanomacrófagos encontrados próximos de vasos sanguíneos. Viana (2021) e Sayed & Younes (2017) demonstraram que a presença de melanomacrófagos pode estar relacionada com a poluição ambiental, outros agentes como bactérias e doenças ou até mesmo o estresse, o que reforça a ideia de que esta alteração esteja relacionada com os contaminantes encontrados no Rio Doce. Singh et al. (2019) também demonstraram que o excesso de ferro na água pode afetar tanto as brânquias quanto o fígado dos peixes, e, além disso, mostra que a contagem de eritrócitos e leucócitos e quantificação de hemoglobina nos indivíduos mais afetados são maiores do que em indivíduos controle.

Com isso, pode-se pressupor que a maior disponibilidade de ferro no ambiente influencia na absorção do mesmo pelas células, fazendo com que fiquem sobrecarregadas deste elemento. Dentro das células, o ferro pode sofrer reações de Haber-Weiss e Fenton (Kehrer, 2000), gerando espécies reativas de oxigênio, que por sua vez causam danos nos eritrócitos ou sinalizam mecanismos apoptóticos, demandando assim uma ação maior dos centros de melanomacrófagos para a eliminação dos eritrócitos danificados ou mortos. E então, para recuperar a diminuição de eritrócitos, pode ocorrer um aumento da eritropoese, visando repor os eritrócitos e manter a metabolização do Ferro.

No período chuvoso, os pontos que apresentaram indivíduos com mais alterações foram o ponto 2 (CAN), onde os peixes exibiram necrose e congestão vascular, com presença maior que 50%, e o ponto 7 (COL), com centros de melanomacrófagos e infiltrações leucocitárias acima de 50%. Por outro lado, o ponto com peixes menos afetados foi o REF, sem alterações com mais de 30% de presença, o que seria esperado por este ponto representar um local menos poluído. Já os pontos 2 e 7 (CAN e COL respectivamente), durante o período chuvoso, apresentaram significativas concentrações de metais (Fe e Al) dissolvidos na água, principalmente em COL (ponto 7), onde houve maior concentração de Al dissolvido e os peixes apresentaram alterações. As concentrações de HPA dissolvidos não foram tão altas, porém, foram os pontos em que apresentaram os maiores níveis, 0.05 $\mu g.L^{-1}$ no ponto 2 (CAN) e 0.08 $\mu g.L^{-1}$ no ponto 7 (COL). Já no sedimento, todos os pontos apresentaram altas concentrações de Al e Fe, com destaque para os pontos 2 e 3 (CAN e NAQ respectivamente). Os HPA encontrados no sedimento durante o verão no ponto 3 (NAQ) foram o Fenanteno, Fluoranteno, Pireno e Criseno mas todos dentro dos limites

legais. Já no ponto 7 (COL), todos os 11 HPA testados foram encontrados e em concentrações comparativamente altas, ainda que dentro dos limites.

Durante o período seco, o ponto que apresentou maiores índices de alterações histológicas nos fígados dos peixes foi o ponto 5 (GOV), enquanto aquele com menores alterações foi o ponto 1 (GUA), sendo que o ponto 7 (COL) também teve índices altos nos peixes analisados. Os peixes dos pontos 2, 3 e 5 (CAN, NAQ e GOV) apresentaram os maiores índices de necrose, que é uma alteração muito grave e irreversível, o que mostra uma grande resposta histopatológica entre os indivíduos presentes entre o alto e médio rio Doce. Deve-se destacar que após o rompimento da barragem de Fundão, uma grande quantidade de rejeito foi contida em Candonga antes de seguir o curso do rio, podendo ter acumulado mais contaminantes na região. A menor frequência de alterações observadas no ponto 1 (GUA) pode estar relacionada a fatores intraespecíficos de resistência dos peixes coletados naquele local. A presença exclusiva do jundiá (*Rhamdia quelen*) no ponto 1 (GUA), poderia indicar que, por ser mais resistente, estaria mais abundante nesse ponto durante os dois períodos e que as demais não teriam aguentado os efeitos pós-rompimento da barragem. Nesse sentido, estudos sobre a tolerância desta espécie aos metais e possíveis mecanismos para evitar a exposição a estes xenobióticos seriam recomendados, visando fornecer informações para explicar a dominância desta espécie na área próxima ao desastre. Outro fator que pode ter influenciado nos dados do período seco do ponto 1 (GUA) é a baixa precipitação no alto rio Doce em relação à região onde os peixes exibiram pior condição, o baixo rio Doce. O ponto 5 (GOV) apresentou maiores índices de alterações em centros de melanomacrófagos, infiltração leucocitária e necrose, as três com valores acima de 60% de presença. Não foram encontradas altas concentrações de metais nesse ponto, mas foi encontrada uma quantidade relevante de Fluoranteno (0.53 $\mu g.L^{-1}$) dissolvido na água durante o inverno.

Já no sedimento, foram observadas altas taxas de Al e Fe, e, apesar de não serem acima do limite, o sedimento do ponto 5 (GOV) apresentou concentrações significativas de HPA, com exceção de Benzo[a]Pireno. O ponto 7 (COL) obteve acima de 60% de presença em melanomacrófago, parasitas e infiltração leucocitária, sendo o segundo ponto com maior índice de Bernet et al. (1999) durante o período seco. Neste ponto, foram encontrados metais dissolvidos na água dentro dos limites estabelecidos e Pireno, também em concentração aceitável, enquanto no sedimento foram observadas concentrações altas de Al e Fe e concentrações mais altas da maioria dos HPA, mas ainda dentro dos limites, com exceção do Benzo[a]Pireno, que ultrapassou o dobro do limite.

Portanto, os pontos mais afetados durante o período chuvoso foram o 2 e 7 (CAN e COL), tanto em questões histopatológicas quanto em relação à contaminação na água e sedimento, enquanto durante o período seco os pontos 2, 3, 5 e 7 (CAN, NAQ, GOV e COL) foram os mais afetados. Estes pontos, em ambos os períodos, estão relacionados com o alto rio Doce (pontos 2 e 3/CAN e NAQ), onde há uma grande taxa de metais depositados no sedimento causando significativas quantidades de indivíduos apresentando alterações graves como a necrose. Já os demais pontos das demais áreas apresentaram altas taxas de centros de melanomacrófagos e infiltrações leucocitárias, indicando respostas inflamatórias contra antígenos. A alta taxa de necrose em alguns pontos é um grande indicativo da contaminação ambiental no local, causando alterações histopatológicas irreversíveis em alguns indivíduos no rio Doce, mesmo 4 anos após o rompimento da barragem de Mariana.

Mesmo após 6 anos do desastre de Mariana, ainda há estudos de anos mais recentes e após esta coleta que indicam que a situação do rio não irá melhorar nos próximos anos (Duarte, 2021) pois o material depositado longo da bacia tenderá a

permancer em um regime de deposição e remobilização, pelas correntes, movimentação antrópica ou chuvas, alterando a toxicidade e biodisponibilidade dos contaminantes no ambiente. As espécies estudadas, bagres e cascudos, vivem e se alimentam predominantemente do substrato, fazendo com que estejam permanentemente em contato com sedimentos e águas contendo esses contaminantes em maiores concentrações, requerendo mais estudos para entender melhor os processos de exposição, depuração e intoxicação aos quais estão sujeitos, devido aos poluentes ambientais introduzidos antropicamente.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do monitoramento ambiental encontrados neste trabalho são importantes para dar suporte e auxiliar os tomadores de decisão nas ações de recuperação, proteção e preservação da qualidade das águas da bacia do rio Doce. No geral, as alterações medidas nos peixes foram moderadas, porém efeitos histopatológicos graves foram encontrados na histologia hepática dos bagres e cascudos de algumas regiões do rio Doce em 2019 (4 anos após o rompimento da barragem de Mariana), os quais aparentemente estão associados com os metais presentes nos resíduos de mineração, mas também outros contaminantes encontrados no sedimento e na água do rio Doce.

6. BIBLIOGRAFIA

ABC, A. B. de C. (2014). Recursos Hídricos no Brasil: problemas, desafios e estratégias para o futuro. In *Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazonia Legal, Secretaria de Recursos Hídricos*. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, p. 158-170.

ANA, A. N. de águas. (2015). *Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompmento da Barragem em Mariana/MG*. Brasilia - DF.

ANA, A. N. de Á. (2019). Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2019: informe anual. In *Agência Nacional de Águas*. Brasilia - DF.

AU, D. W. T. et al. (1999). Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to benzo [a] pyrene. *Environmental Pollution*, v. 104, n. 2, p. 235-247.

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

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

Borsoi, Z. M. F., Torres, S. D. A. (1997). A política de recursos hídricos no Brasil. *Revista do BNDES*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 8, p. 143-165, dez.

Bruslé, J., Anadon, G. G. (1996). The structure and function of fish liver. *Fish Morphology*, v. 76, p. 545-551.

Caputo, L.F.G.; Gitirana, L.B.; Manso, P.P.A. 2010. Técnicas histológicas. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, p. 89-188.

Carvalho, M. S., Ribeiro, K. D., Moreira, R. M., & de Almeida, A. M. (2017). Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. Acta Brasiliensis, 1(3), 37-41. Conama. (2005). Resolução n 357, 18 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, (053), 58–63.

Cupolillo, F., de Abreu, M. L., & Vianello, R. L. (2008). Climatologia da bacia do rio Doce e sua relação com a topografia local. *Revista Geografias*, 4(1), p. 45-60.

Da Silva, M. R., de Campos, A. C. E., Bohm, F. Z. (2013). Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 8, n. 2, p. 46-58.

Diamanti-Kandarakis, E. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Revies*, *30*(4), 293–342.

Dias, C. A., da Costa, A. S. V., Guedes, G. R., de Matos Umbelino, G. J., de Sousa, L. G., Alves, J. H., & Silva, T. G. M. (2018). Impactos do rompimento da barragem

de Mariana na qualidade da água do rio Doce. *Revista Espinhaço*, v. 7(1), p. 21-35.

Duarte, E. B., Neves, M. A., Oliveira, F. B., Martins, M. E., Oliveira, C. H. R., Nurak, 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*, v. 262, p. 127879.

Fontenele, E. G. P. et al. (2010). Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 54, n. 1, p. 6-16.

Fricke, N. F. et al. (2012). Liver histopathology in Baltic eelpout (*Zoarces viviparus*) – A baseline study for use in marine environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, v. 82, p. 1-14.

Gomes, L. de C. et al. (2000). Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 30, n.1, p. 179-185. Available from https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100029.

Guerini, S., Prado, G. P., Dos Passos, M. G. (2014). Hábito alimentar de *Rhamdia quelen* (siluriformes: Pimelodidae) em um trecho do rio Bonito no município de São Domingos, Santa Catarina. *Revista Uningá Review*, v. 18, n. 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*.

Johas, F. S. (2017). Análise do passivo socioeconômico do rompimento da barragem de Fundão (Mariana MG) em novembro de 2015 na bacia do Rio Doce.

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 deo Ouro Preto.

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

Lopes, L. M. N. (2016). O rompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais. *Sinapse Múltipla*, v. 5, n. 1, p. 1.

Kehrer, J.P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, v. 149, p. 43-50.

Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M., & McCain, B. B. (1991). Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the US West Coast. *Environmental Health Perspectives*, 90, 7-15.

Ongley, E. D. (1996). Control of water pollution from agriculture. *Food & Agriculture Org*.

Peixoto, L. S. V. (2020). *Efeitos de micropoluentes em fígado de peixes coletados em riachos de bacias que drenam para o reservatório da Itaipu Binacional (Brasil e Paraguai)*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu. p. 104.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *In*: *Air quality guidelines – Second Edition*. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2000, 29 páginas.

RENOVA. (2019). *Relatório Técnico Anual - Ambiental*.

Rhodes, V. P., 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

Santolin, C. V. A., Ciminelli, V. S. T., Nascentes, C. C., & Windmöller, 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

Sayed, A. H., & Younes, H. A. (2017). Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(2), 97-104.

Schiavini, J. A., Cardoso, C. E., Rodrigues, W. C. (2011). Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente e o Uso de Potenciais Bioindicadores. *Revista Eletrônica TECCEN*, v. 4, n. 3, p. 33-48.

Singh, M., Barman, A. S., Devi, A. L., Devi, A. G., & Pandey, P. K. (2019). Iron mediated hematological, oxidative and histological alterations in freshwater fish *Labeo rohita*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 87-97.

Soares, A.F.S., Leão, M. M. D., Faria, V. H. F., Costa, M. C. M., Moura, A. C. M., Ramos, V. D. V., Vianna Neto, M. R., Costa, E. P. (2013). Occurrence of pesticides from coffee crops in surface water. *Ambi-Agua*, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 62-72.

Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8, 827.

Stentiford, G. D. et al. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, v. 55, n. 2, p. 137-159.

Triebskorn, R., Telcean, I., Casper, H. *et al.* (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Asses*sment, 141: 177–188.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57-149.

Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M., Van Vuren, J. H. J. (2007). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, n. 3, p. 432-440.

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.

Viana, H. C., Jesus, W. B., Silva, S. K. L., Jorge, M. B., Santos, D. M. S., & Neta, R. N. F. (2021). Aggregation of hepatic melanomacrophage centers in S. herzbergii (Pisces, Ariidae) as indicators of environmental change and well-being. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 73, 868-876.

Vieira, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MG Biota*, v. 2, n. 5, p. 5-22.

WHO. (2012). *WHO | State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012*. Retrieved from http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/

Weber, A. A. et al. (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*, v. 190, p. 110165.

Wills, L. P. et al. (2010). Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories. *Environmental health perspectives*, 118(10): 1376-81. doi:10.1289/ehp.0901799

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*, *23*(18). https://doi.org/10.1007/s11356-016-6924-6

7. ANEXO

Quadro 2 – Média da pluviosidade nas áreas do alto, médio e baixo Rio Doce medidas semanalmente pela Fundação RENOVA em seu Boletim Semanal da Qualidade de Água. Os boletins escolhidos foram referentes aos meses de janeiro e fevereiro de 2019. Valores do acumulado de precipitação em mm.

	Alto Rio Doce	Médio Rio Doce	Baixo Rio Doce
07.01.2019	81.43	33.80	32.25
14.01.2019	1.86	0.26	15.25
21.01.2019	0.00	0.00	1.40
28.01.2019	1.53	0.00	2.10
MÉDIA JAN	21.20	8.51	12.75
04.02.2019	5.06	0.00	0.10
11.02.2019	51.30	73.50	48.35
18.02.2019	54.76	22.33	24.75
25.02.2019	44.16	30.66	27.90
MÉDIA FEV	38.82	31.62	25.27

Quadro 3 - Média da pluviosidade nas áreas do alto, médio e baixo rio Doce medidas mensalmente pela Fundação RENOVA em seu Boletim Mensal da Qualidade de Água. Os boletins escolhidos foram referentes aos meses de julho e agosto de 2019. Valores do acumulado de precipitação em mm.

	Alto Rio Doce	Médio Rio Doce	Baixo Rio Doce
Julho.2019	1.30	0.16	29.05
Agosto.2019	9.56	0.93	28.70

Quadro 4 - Concentrações de alguns químicos inorgânicos dissolvidos ($mg.L^{-1}$) detectados em amostras coletadas nos pontos do rio Doce durante os períodos chuvoso e seco de 2019. Os valores em vermelho estão acima dos imites estabelecidos. Adaptado de Dra. Flávia Yoshie Yamamoto (Processo FAPESP 2016/15229-1).

	PERÍODO CHUVOSO						**PERÍODO SECO**					
	Al	Fe	Mn	Cu	Ni	Pb	Al	Fe	Mn	Cu	Ni	Pb
GUA	0.12	0.28	0.41				0.04	0.12	0.13			
CAN	0.19	0.92	0.04				0.05	0.26	0.03			
NAQ	0.43	0.97	0.09				0.20	0.40	0.05			
REF	0.44	1.07	0.04	0.01	0.18		0.12	0.53	0.03			
GOV	0.37	0.76	0.03				0.07	0.15	0.02			
AIM	1.34	1.47	0.06	0.01			0.08	0.09	0.02			0.01
COL	2.18	1.41	0.04				0.08	0.12	0.02			
LIN	1.16	0.93	0.04				0.10	0.20	0.04	0.01		
LIMITE	0.1	0.3	0.1	0.005	0.025	0.01	0.1	0.3	0.1	0.005	0.025	0.01

Quadro 5 - Concentrações de sete Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em $\mu g.L^{-1}$ detectados na água coletada do rio Doce durante os períodos chuvoso e seco. Naf = Naftaleno, MNaf = Metilnaftalenos, Fen = Fenantreno, Fltr = Fluoranteno, Pir = Pireno, Per = Perileno. Os valores em vermelho estão acima dos imites estabelecidos. Adaptado de Dra. Flávia Yoshie Yamamoto (Processo FAPESP 2016/15229-1).

	PERÍODO CHUVOSO								**PERÍODO SECO**							
	Naf	1-MNaf	2-MNaf	Fen	Fltr	Pir	Per	Soma	Naf	1-MNaf	2-MNaf	Fen	Fltr	Pir	Per	Soma
GUA	0.01	0.02						0.03	0.01	0.01		0.01				0.03
CAN	0.01	0.01	0.03					0.05	0.01	0.01						0.01
NAQ								0.00								0.00
REF								0.00								0.00
GOV			0.01					0.01					0.53			0.53
AIM						0.02		0.02		0.01	0.03		0.55	0.56	0.02	1.70
COL	0.01	0.01	0.02			0.03	0.01	0.08						0.03		0.03
LIN	0.01	0.01				0.01		0.01								0.00

Quadro 6 - Poluentes inorgânicos (metais) significativamente presentes no sedimento dos pontos coletados no rio Doce durante os períodos de chuva e seca de 2019 ($mg.L^{-1}$). Os valores marcados são os que estão acima do limite permitido pelas leis ambientais ou com valores muito altos. Adaptado de Dra. Flávia Yoshie Yamamoto (Processo FAPESP 2016/15229-1).

	PERÍODO CHUVOSO						
	Al	As	Cd	Cu	Fe	Hg	Mn
GUA	4713.6	29.07	1.54	26.98	63919.8	<LOQ	8546.4
CAN	11432.6	6.20	0.71	7.15	35743.7	0.09	309.1
NAQ	9426.8	7.58	0.70	6.34	38465.4	0.09	348.5
REF	49931.0	4.84	1.39	14.01	67228.3	<LOQ	729.8
GOV	12434.4	3.84	0.65	6.91	20543.5	0.14	125.7
AIM	18902.6	1.97	0.50	6.82	27520.1	0.12	256.4
COL	9258.5	3.60	0.29	3.55	17081.4	0.08	94.4
LIN	10172.9	3.49	0.28	15.00	16694.2	0.07	152.7
	PERÍODO SECO						
GUA	4941.5	47.76	5.14	14.51	286494.3	1.64	11373.1
CAN	20214.3	26.71	1.31	23.03	59277.2	0.39	1270.6
NAQ	27904.6	17.40	1.56	15.96	81969.9	0.11	1252.0
REF	59276.0	5.90	1.58	17.27	85333.9	0.40	870.8
GOV	42707.0	13.05	1.91	22.78	76734.4	0.30	452.3
AIM	16893.0	3.15	0.37	5.23	22167.8	0.43	105.1
COL	39474.6	6.75	0.72	12.07	40260.8	0.17	203.7
LIN	7343.3	5.13	0.25	2.56	16145.8	0.17	92.8
LIMITE		18.1	3.5	197		0.48	780

Quadro 7 - Alguns dos poluentes orgânicos em µg.L^{-1} detectados no sedimento coletado em pontos do rio Doce durante o período chuvoso e seco de 2019. Fen = Fenantreno, Fltr = Fluoranteno, Pir = Pireno, BeP = Benzo[e]Pireno, BaP = Benzo[a]Pireno, IcdP = Indeno [1,2,3-c,d]Pireno, BghiP = Benzo[g,h,i]Pirileno, BaA = Benzo[a]Antraceno, Cri = Criseno, BbF = Benzo[b]Fluoranteno, BkF = Benzo[k]Fluoranteno. Os valores em vermelho estão acima dos limites estabelecidos. Adaptado de Dra. Flávia Yoshie Yamamoto (Processo FAPESP 2016/15229-1).

PERÍODO CHUVOSO											
	Fen	Fltr	Pir	BeP	BaP	IcdP	BghiP	BaA	Cri	BbF	BkF
GUA	3.62	12.21	3.69	LD	ND	LD	1.74	ND	7.34	ND	ND
CAN	2.95	24.50	4.95	LD	ND	ND	ND	ND	8.91	ND	ND
NAQ	18.56	248.05	226.12	61.91	188.59	104.1	104.4	793.99	669.87	125.776	121.92
REF	5.57	61.12	13.62	ND	ND	ND	ND	ND	16.02	ND	ND
GOV	20.99	127.01	132.74	34.50	127.33	59.23	56.57	179.22	265.73	79.17	63.54
AIM	5.45	48.68	12.40	1.91	ND	ND	ND	3.57	20.24	4.15	4.89
COL	16.45	284.55	296.15	49.38	152.26	75.47	71.90	99.98	83.58	125.5	108.13
LIN	10.99	164.92	236.01	44.81	155.67	70.42	69.09	336.65	321.46	112.37	86.98
LIMITE	515	2355	875		782			385	862		
PERÍODO SECO											
	Fen	Fltr	Pir	BeP	BaP	IcdP	BghiP	BaA	Cri	BbF	BkF
GUA	LD	LD	LD	LD	ND	ND	0.04	ND	2.20	0.26	ND
CAN	2.76	1.19	1.61	0.79	ND	0.34	3.24	ND	17.67	1.68	1.11
NAQ	13.24	105.18	102.25	31.66	90.39	37.29	39.42	121.79	92.20	28.14	33.67
REF	2.72	2.57	2.36	ND	ND	ND	ND	ND	LD	ND	ND
GOV	9.89	44.10	54.14	34.07	ND	79.47	93.71	117.85	166.26	65.89	48.33
AIM	0.60	6.40	8.38	14.89	ND	30.86	27.99	18.11	39.55	29.18	25.09
COL	83.15	717.38	566.03	88.17	257.50	126.71	121.31	632.06	519.89	229.83	177.06
LIN	22.59	198.47	140.48	26.27	92.07	40.99	46.34	180.19	191.13	65.08	52.47
LIMITE	515	2355	875		782			385	862		

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APRESENTAÇÃO REMOTA

Discente: KAORI ONISHI

Título: *"Avaliação da hepatotoxicidade dos poluentes do Rio Doce através das análises histopatológicas no fígado de peixes nativos"*

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa	APROVADA
Profa. Dra. Ligia Maria Borges Marques Santana	APROVADO

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Kaori Onishi** obteve o seguinte conceito:

[X] APROVADO [ ] REPROVADO

São Vicente, 01 de fevereiro de 2022.

Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
(Orientador)

Profa. Dra. Ligia Maria Borges Marques Santana