

ALÉM DAS MEDIÇÕES CONVENCIONAIS: AVALIAÇÃO
DE EFEITOS TÓXICOS EM *Danio rerio* E *Corbicula fluminea*
ASSOCIADOS A ÁGUAS E SEDIMENTOS
CONTAMINADOS POR REJEITOS DE MINERAÇÃO
LIBERADOS APÓS O ACIDENTE COM A BARRAGEM DE
FUNDÃO NO RIO DOCE (ES-MG)

Guacira de Figueiredo Eufrazio Pauly

São Vicente

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

ALÉM DAS MEDIÇÕES CONVENCIONAIS: AVALIAÇÃO
DE EFEITOS TÓXICOS EM *Danio rerio* E *Corbicula fluminea*
ASSOCIADOS A ÁGUAS E SEDIMENTOS
CONTAMINADOS POR REJEITOS DE MINERAÇÃO
LIBERADOS APÓS O ACIDENTE COM A BARRAGEM DE
FUNDÃO NO RIO DOCE (ES-MG)

Guacira de Figueiredo Eufrazio Pauly

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Unesp do campus do
Litoral Paulista, para obtenção do
título de Doutora no Programa de
Pós-graduação em Biodiversidade
de Ambientes Costeiros

São Vicente

2023

P333a

Pauly, Guacira de Figueiredo Eufrazio

Além das medições convencionais: Avaliação de efeitos tóxicos em *Danio rerio* e *Corbicula fluminea* associados a águas e sedimentos contaminados por rejeitos de mineração liberados após o acidente com a barragem de Fundão no Rio Doce (ES-MG) / Guacira de Figueiredo Eufrazio Pauly. -- São Vicente, 2023

183 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Metais. 2. Biomarcadores. 3. Bioacumulação. 4. Toxicidade. 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.

Dedico esse trabalho às minhas filhas, que vivenciaram essa experiência comigo. Dedico também às vítimas do rompimento da barragem do Fundão, em especial, às mães - e suas saudades que só aumentam...

Agradecimentos

Obrigada, Deus, pela vida e por poder compartilhar esse momento na Terra com pessoas tão amadas e especiais, como meus pais, minha família, meus amigos e meus professores. Às minhas filhas, Luara e Luiza, meus amores, que me trouxeram força e motivação nos momentos mais sombrios, me dando a verdadeira razão e alegria de viver, quando eu achava que não tinha. Amo vocês! Ao meu esposo, Eduardo, pelo amor diário, incentivo e eterna parceria. Aos meus pais, Leila e Mario, por me mostrarem o caminho e me dar apoio. Aos meus sogros, Fátima e Antônio, pela ajuda e companhia. Às minhas irmãs, Ana e Maira, às minhas sobrinhas, Sophia, Teresa, Helena e Alice, aos meus cunhados, Lucas e Samuel, e à minha cunhada, Paula, por me trazerem leveza na vida! Aos meus compadres Sheila e Rodrigo, Mariana e Ronaldo, por estarem sempre nos fortalecendo! À minha amiga Katia e ao meu afilhado Leandro, vocês são presentes em minha vida!

Aos profissionais de saúde que ajudaram meus pais a saírem do hospital com vida depois de contraírem covid-19; ao meu eterno amigo Renato, em minhas melhores lembranças, vou sentir saudades.

Ao Movimento Parent in Science, por fazer a diferença para tantas mulheres mães cientistas e me dar um novo olhar sobre minha história, podendo ajudar tantas outras pessoas!

Aos laboratórios parceiros, que trabalharam com tanta seriedade e comprometimento! Sou muito grata pela troca e por conhecer pessoas incríveis!

À Paloma, Fernando, Isabella Bordon, Giulianna, Bruno, Mayana, Flávia, Thaisa, Isabella Beverari, Juliana, Mariana, Caio, Letícia A., Leticia F., Luiza, Débora, e em especial, à Carol, amiga de trabalho e de vida! À Conceição, sempre tão solícita, e aos nossos projetos encantadores! À Fabi, Denise, Nei e a todos os funcionários da Unesp-CLP! À Roberta e à Natalia, aos alunos de graduação das turmas XXII e XXIII que me arrancaram sorrisos e me ensinaram mais do que eu pude imaginar.

Ao meu orientador e meu mentor, Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, por tornar esse trabalho possível, pela orientação, paciência, oportunidades, pelos conhecimentos compartilhados e por me ajudar a tornar esse sonho realidade!!

Aos ensinamentos de Jesus e Buda. Ao zazen.

À Lua, que enfeita as noites; ao Sol que esquentar e dá vida a esse planeta tão maravilhoso; ao firmamento. À música e à internet.

“De tudo se faz canção...

E o coração na curva de um rio...

E lá se vai mais um dia...”

(Milton Nascimento)

Sumário

Resumo.....	16
Abstract	18
Introdução geral	20
Capítulo 1 - Análises químicas, sedimentológicas e ensaios de toxicidade aguda com <i>Daphnia</i> sp. Artigo em elaboração referente à bolsa Fapesp processo 2018/23279-4.	29
Five years after the collapse of the Fundão Dam: a temporal monitoring of chemistry and acute toxicity and what they taught us.....	29
Abstract	29
Introduction	30
Material and method	31
Results	39
Discussion	62
Conclusion	66
References.....	66
Capítulo 2 – Análise de bioacumulação de metais em <i>C. fluminea</i> expostos em sedimentos influenciados por rejeitos de mineração por ICP-OE.	74
SPATIAL-TEMPORAL VARIATIONS OF METALS AND AS IN SEDIMENTS FROM DOCE RIVER AFTER THE FUNDÃO DAM RUPTURE AND THEIR BIOACCUMULATION IN CORBICULA FLUMINEA	74
Abstract.....	74
INTRODUCTION.....	75
MATERIALS AND METHODS	77
Study Area.....	77
Sediment sampling	79
Exposure Bioassays.....	80
Sedimentological analyzes	81
Chemical analyzes.....	82
RESULTS	83
DISCUSSION	89
CONCLUSION.....	95
REFERENCES	96
Capítulo 3 - Análises de biomarcadores e bioacumulação a partir da exposição de <i>Corbicula fluminea</i> . Artigo em elaboração referente à bolsa Fapesp processo 2018/23279-4.	110
Biochemical effects in bivalves exposed to sediments from the Rio Doce basin after the Fundão Dam failure	110
Resumo	110

Introdução	111
Objetivos	115
Materiais e métodos	115
Análises estatísticas	121
Resultados	122
Análise química de sedimentos	122
Análises químicas nos tecidos de <i>C. fluminea</i>	122
Análise de biomarcadores	123
Análise de Componentes Principais (FA/PCA)	130
IBR - Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)	135
Discussão	142
Conclusão	148
Referências	148
Anexo I	157
Capítulo 4 – Análise de toxicidade em embriões de zebrafish em águas e elutriato. Artigo em elaboração referente à bolsa Fapesp Processo 2018/23279-4	158
Ecotoxicological assessment of waters and sediments from Rio Doce after the Fundão Dam rupture using embryos of zebrafish	158
Resumo	158
Introdução	159
Objetivo	160
Material e métodos	160
Area de estudo	160
Análises químicas	161
Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish	161
Análise estatística	163
Resultados	164
Teste de sensibilidade com substância de referência	164
Teste de toxicidade em água	164
Discussão	167
Conclusão	171
Referências	171
Anexo	176
Discussão geral	177
Referências	178
Anexo I	180

Lista de tabelas

Five years after the collapse of the Fundão Dam: a temporal monitoring of chemistry and acute toxicity and what they taught us

Table S1 - Geographical coordinates of the water and sediment sampling sites during the first, second and third sampling surveys.

Table S2 - Geographical coordinates of the water and sediment sampling sites during the fourth and fifth sampling surveys.

Table S3 - Certified value (mg kg⁻¹) and result of mean $\pm$ standard deviation (SD), recovery and relative standard deviation (RSD) of SS-2 (n=3).

Table S4 - Analytical limits of quantification (LOD) for metals in sediments from DRB, for metals in water from DRB.

Table S5 - Analytical limits of quantification (LOQ) for metals in sediments from DRB.

Table S6 - Geoaccumulation Index (I_{geo}). Classification of sediments according to the I_{geo} class. Source: Müller (1979).

Table S7 - Sediment classification values according to the enrichment factor (EF).

Table S8 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples collected in the 1st sampling survey. Values in red indicate levels above that allowed by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Table S9 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples collected in the 2nd campaign. Values in red indicate levels above that allowed by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Table S10 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples from the 4th sampling survey. Values in red indicate levels above the standards established by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Table S11 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples collected in the 5th sampling survey. Values in red indicate levels above that allowed by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Table S12 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 1st sampling survey (Dec 2015). Silt and clay < 63 μ m; Very fine sand (VFS) $\geq$ 63 μ m; Fine sand (FS) $\geq$ 125 μ m; Medium sand (MS) $\geq$ 250 μ m; Coarse sand (CS) $\geq$ 500 μ m; Very coarse sand (VCS) $\geq$ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Table S13 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 3rd sampling survey (Oct/Nov 2016). Silt and clay < 63 μ m; Very fine sand (VFS) $\geq$ 63 μ m; Fine sand (FS) $\geq$ 125 μ m; Medium sand (MS) $\geq$ 250 μ m; Coarse sand (CS) $\geq$ 500 μ m; Very coarse sand (VCS) $\geq$ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Table S14 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 4th sampling survey (Jan/Feb 2019). Silt and clay < 63 μ m; Very fine sand (VFS) $\geq$ 63 μ m; Fine sand (FS) $\geq$ 125 μ m; Medium sand (MS) $\geq$ 250 μ m; Coarse sand (CS) $\geq$ 500 μ m; Very coarse sand (VCS) $\geq$ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Table S15 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 5th sampling survey (Jul/Aug 2015). Silt and clay < 63 μ m; Very fine sand (VFS) $\geq$ 63 μ m; Fine sand (FS) $\geq$

125µm; Medium sand (MS) $\geq$ 250µm; Coarse sand (CS) $\geq$ 500µm; Very coarse sand (VCS) $\geq$ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Table S16 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in the sediment samples collected in the 1st sampling survey (Dec 2015). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Table 1 - Igeo values for sediments collected in the 1st campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Table 2 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 1st sampling survey. FE < 1: Mineral enrichment; 1 < FE < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

Table S17 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in the sediment samples collected in the 3rd sampling survey (Oct/Nov 2016). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Table 3 - Igeo values for sediments collected in the 3rd campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Table 4 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 3rd campaign. Values where FE < 1: Mineral enrichment; 1 < FE < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

Table S18 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in sediment samples collected in the 4th sampling survey (summer 2019). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Table 5 - Igeo values for sediments collected in the 4th campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Table 6 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 4th campaign. Values where FE < 1: Mineral enrichment; 1 < FE < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

Table S19 - Concentration of metals in the sediment samples collected in the 5th sampling survey (winter 2019). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Table 7 - Igeo values for sediments collected in the 5th campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Table 8 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 5th campaign. Values where EF < 1: Mineral enrichment; 1 < EF < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

Table S20 - Person Linear Correlation of *D. similis* toxicity exposed in sediments from the 1st campaign. No correlation was observed between the occurrence of metals and toxicity of ISA assays.

Table S21 - Person Linear Correlation of *D. similis* toxicity exposed in sediments from the 3rd campaign. Significant negative linear correlation of Zn toxicity was observed.

Table S22 - Person Linear Correlation of *D. magna* toxicity exposed in sediments from the 4th campaign. No correlation was observed between the occurrence of metals and toxicity of ISA assays.

Table S23 - Person Linear Correlation of *D. magna* toxicity exposed in sediments from the 5th campaign. No correlation was observed between the occurrence of metals and toxicity of ISA assays.

Spatial-temporal variations of metals and As in sediments from Doce River after the Fundão dam rupture and their bioaccumulation in *Corbicula fluminea*

Table 1 - Concentrations of metals (mg kg⁻¹) in soft tissues of *Corbicula fluminea* exposed to sediments collected in the Doce River basin, in four sampling surveys.

Table 2 - Bioaccumulation factors (BAF) for soft tissues of *Corbicula fluminea* exposed to sediments from the Doce River basin, after 14 days, considering the four sampling surveys.

Biochemical effects in bivalves exposed to sediments from the Rio Doce basin after the Fundão Dam failure

Tabela 1 - Associações (loadings FA/PCA) sobre concentração de metais e respostas de biomarcadores após exposição de *Corbicula fluminea* em sedimentos coletados em 2016.

Tabela S1 - Scores estimados para cada ponto de coleta da 3ª campanha.

Tabela 2 - Associações (loadings FA/PCA) sobre concentração de metais e respostas de biomarcadores após exposição de *Corbicula fluminea* em sedimentos coletados em período chuvoso de 2019.

Tabela S2 - Scores estimados para cada ponto de coleta da 4ª campanha.

Tabela 3 - Associações (loadings FA/PCA) sobre concentração de metais e respostas de biomarcadores após exposição de *C. fluminea* em sedimentos coletados em período chuvoso de 2019.

Tabela S3 - Scores estimados para cada ponto de coleta da 4ª campanha.

Tabela S4 - Classificação das condições dos pontos da 3ª coleta quanto ao IBR (piores condições possuem IBR maiores).

Tabela S5 - Classificação das condições dos pontos da 4ª coleta quanto ao IBR (piores condições possuem IBR maiores).

Tabela S6 - Classificação das condições dos pontos da 5th coleta quanto ao IBR (piores condições possuem IBR maiores).

Tabela S7 - Parâmetros físico-químicos das exposições de *C. fluminea*.

**Ecotoxicological assessment of waters and sediments from Rio Doce after the Fundão Dam rupture
using embryos of zebrafish**

Tabela S1 – Teste de sensibilidade com substância de referência 3,4 DCA (n=20).

Lista de figuras

Five years after the collapse of the Fundão Dam: a temporal monitoring of chemistry and acute toxicity and what they taught us

Figure 1 - Map of the Rio Doce Basin. Sampling sites represented by black squares are surveys carried out in 2015 and 2016. Gray circles represent the samplings sites from the 4th and 5th surveys. Square in red locates IQ.

Figure 2 - Acute toxicity of water samples from the Doce River Basin to *Daphnia* spp. (a) Samples collected in the first sampling survey; (b) Samples collected in the second sampling survey; (c) Samples collected in the fourth sampling survey; (d) Samples collected in the fifth sampling survey Asterisk indicates significant toxicity ($p < 0.05$).

Figure 3 - Acute toxicity test of sediment samples from the Doce River Basin to *Daphnia* spp, based on sediment-water interface exposures. (a) Samples collected in the first sampling survey campaign; (b) Samples collected in the third sampling survey; (c) Samples collected in the fourth sampling survey; (d) Samples collected in the fifth sampling survey. Asterisk indicates significant toxicity ($p < 0.05$).

Spatial-temporal variations of metals and As in sediments from Doce River after the Fundão dam rupture and their bioaccumulation in *Corbicula fluminea*

Figure 1 - Overview of the Doce River Basin (DRB), showing the location of the sampling sites. Black squares indicate sediments the sites sampled in 2015 and 2016, while gray circles indicate sediments sampled in 2019.

Biochemical effects in bivalves exposed to sediments from the Rio Doce basin after the Fundão Dam failure

Figura 1- (a) quantidade das enzimas GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos aos sedimentos da 1^a campanha.

Figura 2 - (a) quantidade das enzimas GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE, em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos da 3^a campanha. Asteriscos indicam diferença com relação ao controle.

Figura 3 - (a) quantidade das enzimas GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE e (g) atividade de metalotioneína, em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos da 4^a campanha. Asteriscos indicam diferença com relação ao controle.

Figura 4 - quantidade das enzimas GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE e (g) atividade de metalotioneína, em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos da 5^a campanha. Asteriscos indicam diferença com relação ao controle.

Figura 5 - Distribuição tridimensional dos loadings da FA/PCA baseada nos dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* e metais em sedimentos de 2016.

Figura 6 - Distribuição tridimensional dos loadings da FA/PCA baseada nos dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* e metais em sedimentos de 2019 (estação úmida).

Figura 7 - Distribuição tridimensional dos loadings da FA/PCA baseada nos dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* e metais em sedimentos de 2019 (estação seca).

Figura 8 – Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 1ª campanha (2015).

Figura 9 - Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 3ª campanha (2016).

Figura 10 - Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 4ª campanha (2019 – estação chuvosa).

Figura 11 - Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 5ª campanha (2019 estação seca).

Ecotoxicological assessment of waters and sediments from Rio Doce after the Fundão Dam rupture using embryos of zebrafish

Figura 1 – Ovos viáveis e inviáveis de *Danio rerio*; 1) ovo viável; 2) ovo inviável (má formação); 3) ovo morto (coagulado).

Figura 2 - Teste de toxicidade com exposição de embriões de zebrafish às amostras de água coletadas em áreas influenciadas pelo rejeito de mineração da barragem do Fundão. Foi utilizado controle negativo em todas as placas onde havia exposição às amostras.

Figura 3 - Larva de *D. rerio* 96h. Foto da exposição ao tratamento controle negativo.

Figura 4 - Taxa de sobrevivência de *D. rerio* expostos às águas coletadas um mês após o derramamento de rejeito de minério de ferro na BRD.

Figura 5 – Comprimento larval de *D. rerio* após 96hpf de exposição em águas coletadas na BRD em 2015

Figura 6 - Taxa de sobrevivência de *D. rerio* expostos às águas coletadas 6 meses após o derramamento de rejeito de minério de ferro na BRD.

Figura 7 - Comprimento larval de *D. rerio* após 96 hpf de exposição em águas coletadas na BRD em 2016.

Resumo

O rompimento da barragem do Fundão, de responsabilidade da Samarco/BHP, na tarde do dia 5 de novembro de 2015, liberou mais de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração de ferro, tendo sido considerado o maior desastre ambiental da história do Brasil até então. Dados iniciais obtidos por diversos estudos indicaram aumento imediato nos níveis de metais em águas e sedimentos na Bacia do Rio Doce, mas contraditórios, no que diz respeito aos efeitos de toxicidade aguda e crônica para alguns modelos clássicos, sendo então necessário avaliar os efeitos a partir de níveis biológicos menores, capazes de responder a exposições mais sutis. O presente estudo teve como objetivo geral avaliar efeitos biológicos associados à contaminação da água e dos sedimentos da Bacia do Rio Doce na área afetada pelo rompimento da barragem do Fundão (MG), a fim de gerar dados sobre os efeitos agudos, crônicos e subcrônicos decorrentes da contaminação por metais, estimando assim potenciais riscos ecológicos. Para isso, amostras de água e sedimentos foram coletadas em diferentes períodos após o desastre, e analisadas quimicamente, bem como os índices geoquímicos e de enriquecimento foram calculados. Concomitantemente, foram realizados ensaios com neonatos de *Daphnia similis* ou *D. magna*, em amostras de água e sedimento (interface sedimento-água), onde 5 organismos foram colocados em 4 réplicas de cada amostra, e expostos por 48h, sob condições controladas, sendo então contados os sobreviventes. Na segunda etapa do estudo, organismos adultos de *Corbicula fluminea*, foram coletados no Rio Ribeira de Iguape (SP), aclimatados em laboratório, e expostos aos sedimentos. Em cada réplica, contendo cerca de 4 cm de sedimento e cerca de 1 L de água de diluição, foram introduzidos 10 organismos. O sistema-teste foi mantido a 25°C e fotoperíodo de 12:12 (claro-escuro), sob aeração. Após 14 dias, os organismos foram sacrificados e as partes moles foram removidas. Foram realizadas análises de bioacumulação de metais, com cálculo do fator de bioacumulação (BAF), bem como analisados os biomarcadores glutathione reduzida (GSH), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), lipoperoxidação (LPO), danos em DNA, atividade de acetilcolinesterase (AChE) e metalotioneína (MT). Por fim, foram realizados ensaios de toxicidade crônica com embriões da espécie *Danio rerio*, expostos às amostras de água. Após a obtenção dos ovos fecundados, estes foram transferidos para microplacas de 24 poços com capacidade de 2 ml contendo as amostras de água, e observados a cada 24 horas em microscópio eletrônico, verificando-se a coagulação, pigmentação do corpo e dos olhos, formação de somitos, desprendimento da

cauda, eclosão e letalidade. Os resultados obtidos revelaram altos níveis de metais em água e sedimentos em amostras coletadas imediatamente ao colapso da barragem, com redução das concentrações ao longo do tempo. Os índices geoquímicos demonstraram ausência de contaminação ou contaminação moderada, com altos índices de enriquecimento de Mn no alto rio Doce, de acordo com os valores de EF. Foi observada toxicidade ocasional em *Daphnia* ssp., porém não correlacionada com os metais medidos. Foi observada bioacumulação importante (BAF>1) para Zn em *C. fluminea*, porém os efeitos causados na biota quanto ao estudo de biomarcadores não foram relacionados diretamente pela contaminação do rejeito de mineração sobre os ecossistemas. Apesar das concentrações de metais acima da legislação, não foi observada diferença estatística significativa com relação ao controle para a sobrevivência ou outros efeitos negativos nos embriões de *D. rerio* expostos às amostras de água coletadas ao longo da BRD. Os resultados obtidos sugerem, portanto, baixa biodisponibilidade dos metais liberados pelos rejeitos, ao menos nos ambientes dulciaquícolas.

Palavras-chave: metais, bioacumulação, biomarcadores, contaminação.

Abstract

The rupture of the Fundão dam, of the responsibility of Samarco/BHP, on the afternoon of November 5, 2015, released more than 50 million m³ of iron mining tailings. It was considered the worst environmental disaster in the history of Brazil so far. Initial data obtained from several studies indicate an immediate rise on the levels of metals in the Doce River Basin, but contradictory results for acute and chronic toxicity using some classic models. Thus, studies evaluating the effects at lower biological levels are required. This study aimed to evaluate the biological effects associated with the contamination of water and sediments of the Rio Doce Basin in the area affected by the rupture of the Fundão dam (MG), in order to generate data on the acute, chronic effects and subchronic effects resulting from contamination by metals, thus estimating potential ecological risks. For this, water and sediment samples were collected at different periods after the rupture and chemically analyzed, and the geochemical and enrichment indices were calculated. Concomitantly, acute toxicity tests were carried out with neonates of *Daphnia similis* or *D. magna*, exposed to water and sediment (i.e. sediment water interface) samples. 5 organisms were exposed in 4 replicates of each sample for 48 hours, and then the survivors were counted. Tests were also carried out with adult organisms of *Corbicula fluminea*, collected in the Ribeira de Iguape river (SP) and exposed to sediments, in flask containing about 4 cm of sediment, 1 L dilution water and 10 organisms. The test system was maintained at 25°C and a photoperiod of 12:12 (light-dark), under aeration. After 14 days, the organisms were sacrificed, and the soft tissues were removed. The bioaccumulation of metals was analyzed, as did the biomarkers glutathione reduction (GSH), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), lipoperoxidation (LPO), DNA damage, acetylcholinesterase activity (AChE) and metallothionein (MT). Finally, chronic toxicity tests with embryos of *Danio rerio* exposed to water samples were performed. Healthy fertilized eggs were obtained and transferred to 24-well microplates containing 2ml of water samples, and observed every 24 hours under an electronic microscope, for checking the coagulation, pigmentation of body and eyes, formation of somites, detachment of the tail, hatching, and lethality. The results obtained revealed high levels of metals in water and sediments in samples collected immediately after the dam collapse, with a reduction of concentrations over time. The geochemical indices demonstrated absence or moderate contamination, with high levels of Mn enrichment in the upper Doce River, according to the EF values. Occasional toxicity was observed in

Daphnia ssp., but not correlated with the measured metals. Important bioaccumulation (BAF>1) for Zn in *C. fluminea* was observed, yet this element was not related with the mining tailings. The results of biomarkers were not directly related to the contamination by the mining tailings. Despite the metal concentrations above the legislation, no difference was observed regarding the control and negative effects on *D. rerio* embryos exposed to water samples. This study evidences that the bioavailability of metals was limited in the Rio Doce basin, with implications for the environmental restoration processes, at least in the freshwater environments affected by the tailings.

Keywords: metals, bioaccumulation, biomarkers, contamination.

Introdução geral

Localizada na região sudeste do Brasil, a Bacia Hidrográfica do Rio Doce possui uma área de drenagem de 84 mil km², abrangendo 229 municípios (203 mineiros e 26 capixabas), com 86% de sua área inserida no estado de Minas Gerais (MG) e 14% no estado do Espírito Santo (ES) (ANA, 2016; Viglio & Cunha, 2016). O Rio Doce tem suas nascentes nas Serras da Mantiqueira e do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, em um relevo acidentado, numa altitude de 1220 m (Vieira, 2009). Com 853 km de extensão, 98% de seu curso estão inseridos no bioma da Mata Atlântica e os outros 2%, ao Cerrado, ambos apresentando alta biodiversidade e endemismo (ANA, 2016). Em seu percurso, o rio atravessa planícies fluviais com alta concentração urbana, drenando extensas áreas em regiões com altitudes menores que 370 m (Viglio & Cunha, 2016; Vergilio, 2021).

A região possui clima tropical úmido, no qual os períodos de chuva se concentram entre outubro e março, com precipitação variando de 800 a 1300 mm, enquanto os períodos de seca ocorrem entre os meses de abril e setembro, com precipitação variando entre 150 e 250 mm (Vergilio et al., 2021; ANA 2023). Os corpos d'água que formam a bacia apresentam temperaturas médias da água acima de 18°C.

A vazão média do Rio Doce é de 900 m³/s, com picos de inundação na estação chuvosa que podem ultrapassar 5000 m³/s durante um período de 24 a 48 horas. A bacia abastece cerca de 3,3 milhões de habitantes, além de representar fonte de água para vários setores econômicos como agricultura, indústrias, siderúrgicas e mineração. No entanto, apenas metade dos municípios da bacia apresenta algum sistema parcial de coleta e tratamento de esgotos, e apenas vinte e oito municípios atingem o nível de 50% de esgoto coletado (Viglio & Cunha, 2016; ANA, 2023). Ao longo da calha principal do Rio Doce existem 4 barramentos para geração de energia a partir de usinas hidrelétricas: UHE Candonga, no Alto Rio Doce, UHE Baguari, no Médio Rio Doce e UHE de Aimorés, no médio-baixo curso do rio, e Mascarenhas, no Baixo Rio Doce e pode ser dividido em Alto Rio Doce, Médio Rio Doce e Baixo Rio Doce (Vieira, 2009).

A região do quadrilátero ferrífero (QF), situada no centro-sul de MG, é adjacente às nascentes dos afluentes do Rio Doce (Orlando et al., 2020). Sua mineralogia é conhecida pela presença de quartzo, caulinita, goethita, hematita e arsenopirita, e que tem sido explorada por mineradoras regulares ou não (Pires et al., 2003; Orlando et al., 2020). O QF abrange cidade como Ouro Preto, Mariana, Itabira, Itaúna entre outras, numa área de 7.000 km². Nessa região, a Bacia do Rio Doce pode ser denominada de Alto Rio Doce,

e nessa região as atividades garimpeiras e de mineração são comuns desde o século XVII, onde os rios funcionam como canais receptores de rejeitos e efluentes de diferentes atividades antrópicas (Borba et al., 2003; Renova, 2019). A exploração de ouro e, mais recentemente, de minério de ferro, foram práticas que contribuíram para a ocorrência de concentrações anômalas de As e Fe nesse trecho da bacia, onde concentrações elevadas de Hg também foram relacionadas à amalgamação do ouro (Duarte et al., 2021; Yamamoto et al, 2023). Essa região possui altas concentrações de metais tanto pela litologia quanto pela influência antrópica de exploração mineral contribuindo para o acúmulo de contaminantes nos compartimentos abióticos como água e sedimento (Costa et al., 2006; Hatje et al., 2017).

O trecho do Médio Rio Doce abrange áreas de Matipó até a divisa entre os estados de MG (em Aimorés) e ES (Baixo Guandú) (Vieira, 2009). Nesse trecho, a bacia é caracterizada pela alta concentração de centros urbanos, além de atividades industriais de diversos ramos, como siderúrgicas, indústrias ligadas à fabricação de baterias, celulose, além de mineradoras, formando um complexo industrial conhecido como ‘Vale do Aço’, com baixa qualidade ambiental, principalmente pela ausência de coleta e tratamento de esgoto doméstico e de efluentes industriais (Vasconcelos et al., 2011; ANA, 2016).

Por fim, o Baixo Rio Doce, é a região delimitada entre a UHE Mascarenhas até a foz do rio Doce, no Oceano Atlântico, na região de Regência, no município de Linhares (Vieira, 2009). Nesse trecho, os relevos apresentam menor declividade, com predominância de atividades agropecuárias, também contribuindo para a contaminação do ambiente aquático, ao lado da degradação ambiental causada pelo baixo índice de tratamento de efluentes (Yamamoto et al., 2023). Na foz do rio e zona costeira adjacente, ocorrem o turismo e a pesca artesanal; além disso as áreas costeiras adjacentes incluem unidades de conservação, como por exemplo, a reserva biológica de Comboios.

O processo de ocupação da Bacia do Rio Doce está relacionado com o ciclo minerador, fato que provocou alterações paisagísticas no decorrer dos séculos, atraindo também atividades industriais relacionadas com a exploração dos recursos minerais da região, o que favoreceu a concentração urbana às margens do rio, assim como a instalação de polos siderúrgicos (Roeser & Roeser, 2013; ANA 2016). Alguns autores observaram que a mineração favorece o aumento das concentrações de metais como As, Al, Cu, Cd, Cr, Co, Hg, Fe, Pb, Ni e Mn nos leitos dos rios, apresentando relação com efeitos tóxicos em organismos expostos às amostras de água e sedimentos coletadas na região da bacia

do Rio Doce (Andrade, 2003; Varejão et al., 2009; Rodrigues et al., 2013; Lima e Silva et al., 2013; Lacerda & Roeser, 2014).

A barragem do Fundão, pertencente à mineradora brasileira Samarco S/A e à BHP Billiton (anglo-australiana), e localizada no município de Mariana (MG) a aproximadamente 150 km da capital Belo Horizonte, se rompeu no dia 5 de novembro de 2015, liberando mais de 50 milhões de m³ de rejeitos de minério de ferro nos rios da bacia, os quais percorreram mais de 600 km ao longo do curso do Rio Doce até chegar ao Oceano Atlântico, no município de Regência (ES) (Escobar, 2015; Hatje et al, 2017).

Os rejeitos de mineração liberados nessa catástrofe causaram diversos impactos ambientais devido à força e o volume do material lamoso, como alterações granulométricas e cobertura de ambientes naturalmente arenosos por partículas mais finas, soterramento de fauna, aumento da turbidez, diminuição do oxigênio dissolvido, exposição de organismos aos níveis de metais elevados, como Fe, Mn, As e Hg em águas e sedimento amostrados ao longo do rio Doce, além de 19 vítimas e dos impactos socioambientais difíceis de serem recuperados (Segura et al., 2016; Milanez & Losekann, 2016; Hatje et al., 2017; Gomes et al., 2019; Bernardino et al., 2019).

Estima-se que a Usina Hidrelétrica de Candonga (UHE ‘Risoleta Neves’), localizada no Rio Doce a 120 Km do rompimento, reteve cerca de 10 milhões de m³ de rejeitos em seu reservatório (30% dos rejeitos derramados) (ANA, 2016; Renova, 2019). Apesar da diminuição ou ausência de depósito de lama nas margens do rio após da barragem da UHE de Candonga, o carreamento de sedimentos finos passou a alterar a qualidade da água de ambientes à jusante, até atingir o mar (ANA, 2016; Renova, 2019).

De acordo com o relatório técnico do IBAMA (2015), as consequências dos impactos ambientais diretos foram o desaparecimento da ictiofauna silvestre, perda da biodiversidade aquática, fragmentação de habitats, destruição da vegetação nativa e de áreas de preservação permanente e alteração na qualidade da água. Gomes et al. (2017) observaram que imediatamente após o acidente ocorreu aumento da concentração de metais traço como Cr, Fe, Al e Zn, acompanhado de mudança significativa da composição da biota, principalmente devido ao soterramento dos organismos amostrados. Hatje et al. (2017) observaram níveis de Cr acima de TEL (*Threshold Effect Level*), e níveis de As, Cd, Fe, Mn e Ni acima de UET (*Upper Effects Threshold*) em vários pontos de coleta ao longo da bacia do Rio Doce, 3 meses após o rompimento da barragem, além das alterações granulométricas observadas, evidenciadas pela predominância de silte e argila, quando comparados com dados de estudos anteriores ao rompimento (Duarte et al., 2021).

Apesar da litologia local contribuir com a ocorrência de maiores concentrações de Fe e As, por exemplo, na bacia do rio Doce, há forte influência de contaminação por oligoelementos de fontes antropogênicas em águas e sedimentos da região, onde níveis de contaminantes metálicos podem ultrapassar valores de *background* (valor referência para local sem influência de atividades antrópicas), somado à remobilização de sedimentos contaminados antes do rompimento (Costa et al, 2006; Segura et al, 2016).

Por sua vez, a biodisponibilidade de metais em água e sedimento depende das características físico-químicas do ambiente, onde os metais podem apresentar mudança na sua espécie química, ou seja, na reatividade em função de mudanças nas cargas elétricas, ou podem ainda estar adsorvidos às partículas sedimentares, dissolvidos na água na forma de íon livre, ou ainda formando complexos organo-minerais (Abessa, 2016). Alguns fatores físico-químicos como pH, potencial redox (Eh) e teor de matéria orgânica podem favorecer ou não a liberação dos metais das partículas sedimentares (Abessa, 2016; Chapman & Wang, 2001).

Diante desse quadro de inúmeros impactos ambientais na região da bacia do Rio Doce, há necessidade de avaliação de qualidade ambiental e biomonitoramento a partir de análises físico-químicas da água e do sedimento, testes ecotoxicológicos que forneçam informações sobre as respostas biológicas frente tais alterações, bem como a dados de bioacumulação e utilização biomarcadores. Análises químicas são importantes para fornecimento de dados sobre a natureza, grau e abrangência da contaminação do ambiente aquático, incluindo as matrizes aquosas e o sedimento (Long & Chapman, 1985). Porém, para obtenção da importância biológica que as concentrações dos contaminantes representam à fauna e ao ambiente, são necessários dados ecotoxicológicos (Long & Chapman, 1985) que indiquem os efeitos sobre os receptores biológicos.

Esses dados podem ser obtidos através de testes de toxicidade, os quais são baseados na exposição de organismos, determinados de acordo com hábito de vida, importância biológica entre outras características, a uma substância bioativa, permitindo analisar efeitos agudos e/ou crônicos decorrentes dessa exposição (Abessa, 2016); e ensaios com biomarcadores, os quais consistem na detecção e medida de alterações fisiológicas, bioquímicas ou histológicas devido à exposição a estressores ambientais (Adams, 2005). Nesse contexto, testes de toxicidade e análises de biomarcadores permitem avaliar impactos ambientais causados por contaminantes, como metais (Matranga et al, 2012; Gusso-Choueri et al., 2016; Jordão et al, 2002; Clemow & Wilkie, 2015; Vlahogianni & Valavanidis, 2007). Da mesma forma, dados de bioacumulação são

importantes para avaliação da biodisponibilidade de metais a partir da exposição de organismos aos sedimentos podem ajudar a elucidar e prever os efeitos negativos aos quais a biota pode estar exposta (Cruz et al., 2021).

Organismos da espécie *Daphnia* sp. são organismos planctônicos e filtradores, base da cadeia alimentar, mundialmente utilizados como organismos-teste para ensaios de toxicidade pela facilidade de serem manipulados, rapidez da obtenção de resultados e por serem organismos sensíveis às substâncias químicas (ABNT, 12713).

Corbicula fluminea são bivalves sésseis filtradores e escavadores, muito utilizados em estudos ecotoxicológicos e de monitoramento ambiental (Bilos, et al., 1998; Abaychi & Mustafa, 1988) pela capacidade que possuem de acumular poluentes (Fisk, 2001). Além disso, a utilização de biomarcadores através dos seus tecidos pode fornecer informações sobre alterações fisiológicas e elucidar os efeitos negativos da exposição ao ambiente contaminado.

Por fim, os peixes são organismos modelo para estudos ecotoxicológicos devido ao contato direto com o meio aquático e à capacidade de acumular poluentes em seus tecidos (Fisk et al., 2001). A espécie *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) é um modelo largamente utilizado para análises científicas, sendo um dos organismos mais utilizados mundialmente em testes ecotoxicológicos devido à facilidade de adaptação em cultivos laboratoriais, tolerância às alterações de temperatura, pH e dureza da água, sensibilidade às substâncias químicas, além de um ciclo de vida curto, alta fecundidade e ovos transparentes (Wang et al., 2017; Creaser, 1934).

Objetivo e estrutura da tese

O objetivo geral deste estudo é analisar quimicamente águas e sedimentos e relacionar possíveis efeitos agudos e crônicos à contaminação de ambos os compartimentos da bacia do rio Doce (BRD), após o rompimento da barragem do Fundão (MG), coletados entre 2015 e 2019, a partir da exposição de organismos de diferentes níveis de organização biológica, a fim de medir respostas associadas à exposição em níveis ambientais, de modo a fornecer informações sobre possíveis riscos ecológicos. Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos são:

- Analisar quimicamente amostras de água e sedimento coletados ao longo da BRD e comparar os resultados com as leis vigentes da resolução CONAMA 357/05 (para água) e 454/12 (para sedimentos) e valores de background, de acordo com a literatura;

- Avaliar a toxicidade das amostras de água e sedimentos em neonatos de *Daphnia* sp. e correlacionar dados de toxicidade com metais medidos em ambas as matrizes;
- Avaliar medidas de bioacumulação de metais nos tecidos *Corbicula fluminea*, após exposição em laboratório aos sedimentos coletados ao longo da bacia;
- Avaliar efeitos subletais sobre bivalves *Corbicula fluminea*, expostos a sedimentos coletados nas áreas afetadas, a partir de biomarcadores bioquímicos, e relacionar as respostas com as concentrações de metais medidos nas amostras de sedimentos;
- Avaliar toxicidade de água em embriões e larvas de *Danio rerio*.

Capítulo 1: apresenta os dados químicos de água e sedimentos coletados entre os anos de 2015 e 2019, ao longo da BRD após o rompimento da barragem do Fundão, assim como cálculos de contaminação metálica e enriquecimento metálico a partir dos valores de Índice Geoquímico (Igeo) e Fator de Enriquecimento (EF), bem como efeitos tóxicos em neonatos de *Daphnia similis* ou *Daphnia magna* expostos em água e sedimentos, e a correlação entre os resultados de toxicidade e as concentrações de metais encontrados nos compartimentos.

Capítulo 2: apresenta dados de bioacumulação em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos coletados ao longo da BRD, entre 2015 e 2019, e os respectivos valores de fator de bioacumulação (BAF).

Capítulo 3: apresenta dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos coletados ao longo da BRD, entre 2015 e 2019, assim como dados de análise fatorial de componentes principais (FA/PCA), para analisar a associação entre os efeitos observados e os metais medidos em sedimentos, assim como valores de resposta integrada de biomarcadores (IBR), para analisar o grau de efeito em cada ponto amostral.

Capítulo 4: apresenta dados de ensaios ecotoxicológicos de exposição de embriões de *Danio rerio* em águas coletadas ao longo da BRD entre 2015 e 2016.

Referências

Abaychi, J. K., & Mustafa, Y. Z. (1988). The asiatic clam, *Corbicula fluminea*: An indicator of trace metal pollution in the Shatt al-Arab River, Iraq. *Environmental Pollution*, 54(2), 109–122. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(88\)90141-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(88)90141-8)

- Abessa, D. M. S. (2016). *Avaliação de risco ecológico no Rio Ribeira de Iguape (SP , Brasil) devido à contaminação por antigas atividades de mineração*. Tese de Livre-Docência ((Ciências Biológicas – Saneamento Ambiental e Ecotoxicologia Aquática) – Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista.
- ABNT NBR 12713. (2016). Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) Aquatic. *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, 4^o Edição, 1–23. Retrieved from <http://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/7483>
- ANA - Agência Nacional de Águas - Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. (2016). Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG. *Cunjunтура Dos Recursos Hídricos No Brasil*, 1, 1–50.
- Andrade, C. A. (2003). *Estudo ecotoxicológico no trecho médio da Bacia do Rio Doce - MG.pdf*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- Bernardino, A. F., Pais, F. S., Oliveira, L. S., Gabriel, F. A., Ferreira, T. O., Queiroz, H. M., & Mazzuco, A. C. A. (2019). Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA. *PeerJ*, 2019(11), 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.8042>
- Bilos, C., Colombo, J. C., & Rodriguez Presa, M. J. (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and asiatic clams (*corbicula fluminea*) of the Río de La Palta estuary, Argentina. *Environ. Pollut*, 99, 1–11.
- Chapman, P. M., & Wang, F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200102>
- Clemow, Y. H., & Wilkie, M. P. (2015). Effects of Pb plus Cd mixtures on toxicity, and internal electrolyte and osmotic balance in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 161, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.032>
- Costa, A. T., Nalini Jr, H. A., Castro, P. T. A., Lena, J. C., 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 Hydrochimica et Hydrobiologica*, 34(3), 245–256. <https://doi.org/10.1002/aheh.200400625>
- Creaser, C. W. (1934). The Technic of Handling the Zebra Fish (*Brachydanio rerio*) for the Production of Eggs Which Are Favorable for Embryological Research and Are Available at Any Specified Time Throughout the Year. *Copeia*, 1934(4), 159. <https://doi.org/10.2307/1435845>
- Cruz, A. C. F., Pauly, G. F. E., Araujo, G. S., Gusso-Choueri, P., Fonseca, T. G., Campos, B. G., ... Abessa, D. M. S. (2021). Metal Bioaccumulation by the Neotropical Clam *Anomalocardia flexuosa* to Estimate the Quality of Estuarine Sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03062-x>
- D'Azeredo Orlando, M. T., Galvão, E. S., Sant'Ana Cavichini, A., Gabrig Turbay Rangel, C. V., Pinheiro Orlando, C. G., Grilo, C. F., ... da Silva Quaresma, V. (2020). Tracing iron ore tailings in the marine environment: An investigation of the Fundão dam failure. *Chemosphere*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127184>

- Duarte, E. B., Neves, M. A., de Oliveira, F. B., Martins, M. E., de Oliveira, C. H. R., Burak, D. L., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- Escobar, H. (2015). Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. *Science*, 350(6265), 1138–1139. <https://doi.org/10.1126/science.350.6265.1138>
- Fisk, A. T., Hobson, K. A., & Norstrom, R. J. (2001). Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environmental Science and Technology*, 35(4), 732–738. <https://doi.org/10.1021/es001459w>
- 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>
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., Santos, G. S., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., ... de Sousa Abessa, D. M. (2016). Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1–2), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.025>
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>
- IBAMA. (2015). Laudo Técnico Preliminar, 74. Retrieved from http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_pr_eliminar_ibama.pdf
- Jordão, C. P., Pereira, M. G., & Pereira, J. L. (2002). Metal contamination of river waters and sediments from effluents of kaolin processing in Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 140(1–4), 119–138. <https://doi.org/10.1023/A:1020179223867>
- Lacerda, F. M., & Roeser, H. M. P. (2014). Análise geoquímica e ambiental para descrição da Bacia do Rio Oratórios (MG). *Geochimica Brasiliensis*, 28(2), 227–236. <https://doi.org/10.5327/Z0102-9800201400020010>
- Lima e Silva, C., Costa, A. T., Landa, G. G., Fonseca, H. F. C., & Silveira, A. (2013). Evaluation of sediment contamination by trace elements and the zooplankton community analysis in area affected by gold exploration in Southeast (SE) of the Iron Quadrangle , Alto Rio Doce , (MG) Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensis*, 25(2), 150–157. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S2179-975X2013000200006>
- Matranga, V., Pinsino, A., Randazzo, D., Giallongo, A., & Dubois, P. (2012). Long-term environmental exposure to metals (Cu, Cd, Pb, Zn) activates the immune cell stress response in the common European sea star (*Asterias rubens*). *Marine Environmental Research*, 76, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.008>
- Milanez, B., Losekann, C., & (Orgs.). (2016). *Desastre no vale do Rio Doce - Antecedentes, impactos e ações sobre a destruição*.
- RENOVA. (2019). Relatório Trimestral Simplificado - Programa de Monitoramento Quali-Quantitativo Sistemático de Água e Sedimentos – PMQQS, (31), 36420.
- 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. *Environmental Earth Sciences*, 68(4), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-1799-4>
- Roeser, H. M. P., & Roeser, P. A. (2013). O Quadrilátero Ferrífero - Mg, Brasil: Aspectos Sobre Sua História, Seus Recursos Minerais E Problemas Ambientais Relacionados. *Geonomos*, 18(1), 33–37. <https://doi.org/10.18285/geonomos.v18i1.67>
- 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., Ângela, M., Menezes, B. C., Silva, M. A., Rückert, G. V., & Oliveira, A. H. (2011). NAA: 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*, 113–126. <https://doi.org/10.1007/s00710-003-0238-3>
- Vergilio, C. dos S., Lacerda, D., da Silva Souza, T., de Oliveira, B. C. V., Fioresi, V. S., de Souza, V. V., ... 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). *Science of the Total Environment*, 756, 143697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143697>
- Vieira, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MGBiota*, 2(5), 5–22. Retrieved from http://ief.mg.gov.br/images/stories/MGBIOTA/mgbiota11/mgbiot_v.2n.5.pdf#page=5
- Viglio, E. P., & Cunha, F. G. da. (2016). *Atlas Geoquímico da Bacia do Rio Doce - Minas Gerais e Espírito Santo*. Rio de Janeiro: CPRM - Serviço geológico do Brasil.
- Vlahogianni, T. H., & Valavanidis, A. (2007). Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry and Ecology*, 23(5), 361–371. <https://doi.org/10.1080/02757540701653285>
- Wang, Y., Lv, L., Yu, Y., Yang, G., Xu, Z., Wang, Q., & Cai, L. (2017). Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*). *Chemosphere*, 170, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>

Capítulo 1 - Análises químicas, sedimentológicas e ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia* sp. Artigo em elaboração referente à bolsa Fapesp processo 2018/23279-4.

Five years after the collapse of the Fundão Dam: a temporal monitoring of chemistry and acute toxicity and what they taught us.¹

Guacira de F. E. Pauly ^{a*}; Fernando C. Perina ^b; Flávia Y. Yamamoto ^a, Bianca S. M. Kim ^c; Tailisi Hoppe Trevizani; Ana Carolina Feitosa Cruz ^a; Caio Cesar Ribeiro^a; Luciana Menezes ^d; Dante Pavan; Rubens C. L. Figueira ^c; Denis M. S. Abessa ^a.

^a Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista, São Vicente-SP, Brasil

^b Assistant Researcher in Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM). Universidade de Aveiro

^c Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

^d Instituto de Pesca de São Paulo

*Corresponding author: guafe@yahoo.com.br

Abstract

In November 2015, the Fundão dam failed and released millions of tons of metals-rich tailings into the Doce River Basin (DRB), causing catastrophic effects that reached the Atlantic Ocean, which could lead to serious ecological problems. This study aimed to evaluate the geochemistry and toxicity of water and sediment samples collected in the DRB from 2015 to 2019, determining space and temporal trends. Overall, higher concentrations of metals and As in water and sediments were observed immediately after the dam breakage, but the levels exhibited a decreasing trend along time, although the levels of some elements such as As and Mn remained high in the Upper DRB. The geochemical indices indicated mostly lack to moderate contamination, and the EF demonstrated higher enrichment of Mn in the Upper DRB. Acute toxicity to water fleas (*D. similis* and *D. magna*) was occasionally observed in waters and sediments, but reference samples were toxic and the short-term effects were not correlated with metals and As. Overall, results showed limited bioavailability of metals and As, and a reducing trend in their concentrations, indicating an ongoing recovery process.

Key-words: enrichment factor, geochemical index, dam, toxicity, *Daphnia* sp.

¹ A ser submetido na revista Environmental Monitoring and Assessment

Introduction

Mining activities have been often associated with direct and indirect alterations of terrestrial and aquatic ecosystems, which include landscape destruction, deforestation, and contamination of water and soil due to the processes of production and extraction of minerals. Metals-rich residues from mining extraction and manufacturing are capable of altering the geochemical composition of sediments and increase the bioavailability of these elements (Liccardo et al., 2004; Varejão et al., 2009; Lins et al., 2000; Rodrigues et al., 2013).

In Brazil, the Iron Quadrangle region (IQ), located in the state of Minas Gerais (MG) (Figure 1), is known for the intense exploitation of iron ore since the 16th and 17th centuries, and the mining waste produced by the historical exploitation of metals constitutes one of the main sources of pollution for the region (Rodrigues et al., 2013; Hatje et al., 2017). The mining activity has led to an increase in the concentration of metals such as As, Cd, Cu, Cr, Fe, Co, Ni, Pb, Mn, and Al in the nearby riverbeds (Souza et al., 2012; Lacerda & Roeser, 2014; Queiroz et al., 2021).

The scenario of historical chronic contamination was aggravated after the rupture of the Fundão dam (Mariana - MG), on November 5, 2015, that released more than 50 million m³ of potentially toxic iron ore tailings into the Doce River Basin (DRB). The wave of ore mud travelled more than 600 km along the river course and reached the estuary and the Atlantic Ocean, affecting the landscape and riverine ecosystems, as well as subsistence activities, water supply, provision of services to tourism (Marta-Almeida et al., 2016; Brasil, 2015). The disaster was considered the worst environmental accident in the country involving mining wastes so far.

Gomes et al. (2017) observed that immediately after the accident there was an increase in the concentrations of several trace metals such as chromium, iron, aluminum, zinc, and barium, accompanied by a significant change in the composition of the biota. Hatje et al. (2017) reported high concentrations of Cr and Fe in sediments from the upper DRB, and Cd concentrations above TEL (*Threshold Effect Limit*) in several sampling stations. Duarte et al. (2021) observed that after the collapse of the Fundão dam, sediments from the lower DRB, at the state of Espírito Santo (ES) showed textural changes, with an increase of the silt and fine sand fractions, when compared to sediments from studies carried out prior to the rupture, and that such sediments showed levels of As and Cd above the values determined by CONAMA 454/2012 for dredged sediments (Brasil, 2012). According to the IGAM (2017), between November and December 2015, an increase in the concentrations of Al, Fe, Mn, Cu, and Pb was observed in the waters affected by the disaster. Other studies reported increased levels of metals and metalloids throughout the DRB (Macêdo et al., 2020; Passos et al., 2020; Weber et al., 2020). The abrupt impact of the mud wave also altered the grain size distribution of several stretches of the Rio Doce, due to the increase of muddy fractions, characteristic of mining tailings (Duarte et al., 2021).

A main challenge for studying the impacts of the Fundão dam rupture is to determine how the levels of metals have changed and if recovery processes are taking place. This information is critical to the understanding of the ecological effects and risks due to contamination, at short and long terms, and is also necessary to support public policies and restoration actions. However, such analyzes are not that simple, because the sedimentary basin involving the upper DRB, especially the IQ region, is naturally rich in several elements, including Fe, Al and Mn (Oliveira et al., 1979). In addition, the historical exploitation of minerals

along the DRB (particularly gold and iron) has led to increased levels of metals in water and sediments (Borba et al., 2003). Other contamination sources have also contributed to the high metals concentrations in the DRB, such as urban effluents and drainage, industrial effluents (especially those from the Vale do Aço), and agriculture (ANA, 2015; Yamamoto et al., 2023). Studies have shown metallic enrichment and interference from mining activities in sediments of DRB before and after the dam failure (Costa et al, 2006; Hatje et al., 2017; Cagnin et al, 2017; Duarte et al, 2021).

Chemical analyzes provide data on the nature, degree and extent of contamination of the aquatic environment. Therefore, chemically analyzing water and sediments allows the assessment of environmental quality based on the quantification of concentrations of elements or chemical substances in these compartments, which may be used to compare with quality indices or reference concentration levels (*background*) (Costa et al., 2010). These *background* values are normal ranges of concentrations of a determined element or substance for a given region, allowing determining anomalous concentrations when the environment is under anthropogenic interference (Galuszka, 2007; Vicq et al, 2015).

However, chemical analyzes alone are unable to determine the toxic effect to the biota (or to humans), thus environmental assessments require the use of ecotoxicological techniques (Long & Chapman, 1985), such as toxicity tests, biomarkers, and ecological approaches. Such techniques indicate the adverse effects to the biota, although they are unable to determine the causes of the effects. In order to reduce the uncertainties of using single approaches in environmental assessments, Long & Chapman (1985) recommended the adoption of the weight of evidence approach, in which chemical and biological techniques are used simultaneously.

The use of different approaches to assess environmental quality analysis is important to accurately assess the ecosystem response in the medium and long term (Buruaem et al., 2013). Thus, in addition to geochemical analysis, studies have employed toxicity tests as a form of assessing the potential adverse effects of the measured chemicals (Morais et al., 2013; Buruaem et al., 2013). Freshwater organisms of the species *Daphnia* sp. are suitable model organisms for ecotoxicological studies due to their sensitivity to chemical substances, and the testing methods with the organism are cost-effective and rapid (Buratini et al., 2004; Kim et al., 2015).

This study aimed to perform a long-term assessment of the environmental quality of the DRB, after the Fundão dam rupture, consisting of chemical analyses of metals in water and sediment samples and acute toxicity to *Daphnia similis* or *D. magna*.

Material and method

Study area

The Doce River Basin is located between the states of MG and ES (Figure 1) and can be divided into Upper, Middle and Lower DRB (Yamamoto et al., 2023). The Upper DRB extends from the river springs DRB to the confluence with the Piracicaba River (Vieira, 2009; Coelho, 2009). This region is marked by mining activities, agriculture, dams for generating electricity or storing mining residues, and urban occupation (IGAM, 2017). The Middle DRB extends from the Piracicaba River to the border of the states of MG and ES, in Baixo Guandu, and is characterized by industrial activities in the Vale do Aço (especially steel plants but not only), the presence of some large cities such as Governador Valadares, and

hydroelectric power plant installations (IGAM, 2017; Vieira, 2009). The low DRB extends from the Mascarenhas Hydroelectric Power Plant, in Baixo Guandu, to the Rio Doce mouth in the Atlantic Ocean, on the north coast of ES (Vieira, 2009). This region is markedly dominated by agricultural activities; fishing and tourism are relevant in the estuarine portion and adjacent coastal zone.

The sampling sites of water and sediment samples were distributed all along the DRB, ranging from the upstream of the Fundão Dam to the river mouth. Five sampling surveys were carried out: the first one was carried out between November and December 2015 (shortly after the disaster); the second one took place between April and March 2016; and the third campaign was carried out in November 2016. The fourth and fifth sampling surveys were conducted in January and July 2019, respectively. In the first three sampling surveys, the sampling sites distribution followed the grid established by the Independent Environmental Impact Assessment Group - GIAIA, while the 4th and 5th sampling surveys used a slightly different set of sampling sites, which considered the previous results and the set of contamination sources, including the tailings from the Fundão dam (figure 1). The geographic coordinates are presented in tables S1 and S2. In the 1st, 4th and 5th surveys, water and sediments were collected; in the 2nd survey only water samples were collected, while in the 3rd survey only sediments were obtained.

Water samples were collected at 30 cm from the water surface, by using Teflon bottles, and placed in 1L plastic bottles. Aliquots of the water samples were acidified with 0.5% nitric acid (HNO₃) (pH<2) and conditioned at 4°C until the chemical analysis, while aliquots for ecotoxicological analysis were kept refrigerated at 4°C. Sediment samples were collected with a Petersen-type dredge or plastic shovels (GIAIA, 2016), or Van Veen grab sampler, at 10 m from the riverbank, with a depth of 15 cm. The sediments were stored in plastic bags or flasks, duly identified, and transported to the laboratory, where aliquots were separated; those aimed to ecotoxicological analyses were stored in a refrigerator at 4°C while those for geochemical analyses were kept frozen at -20°C.

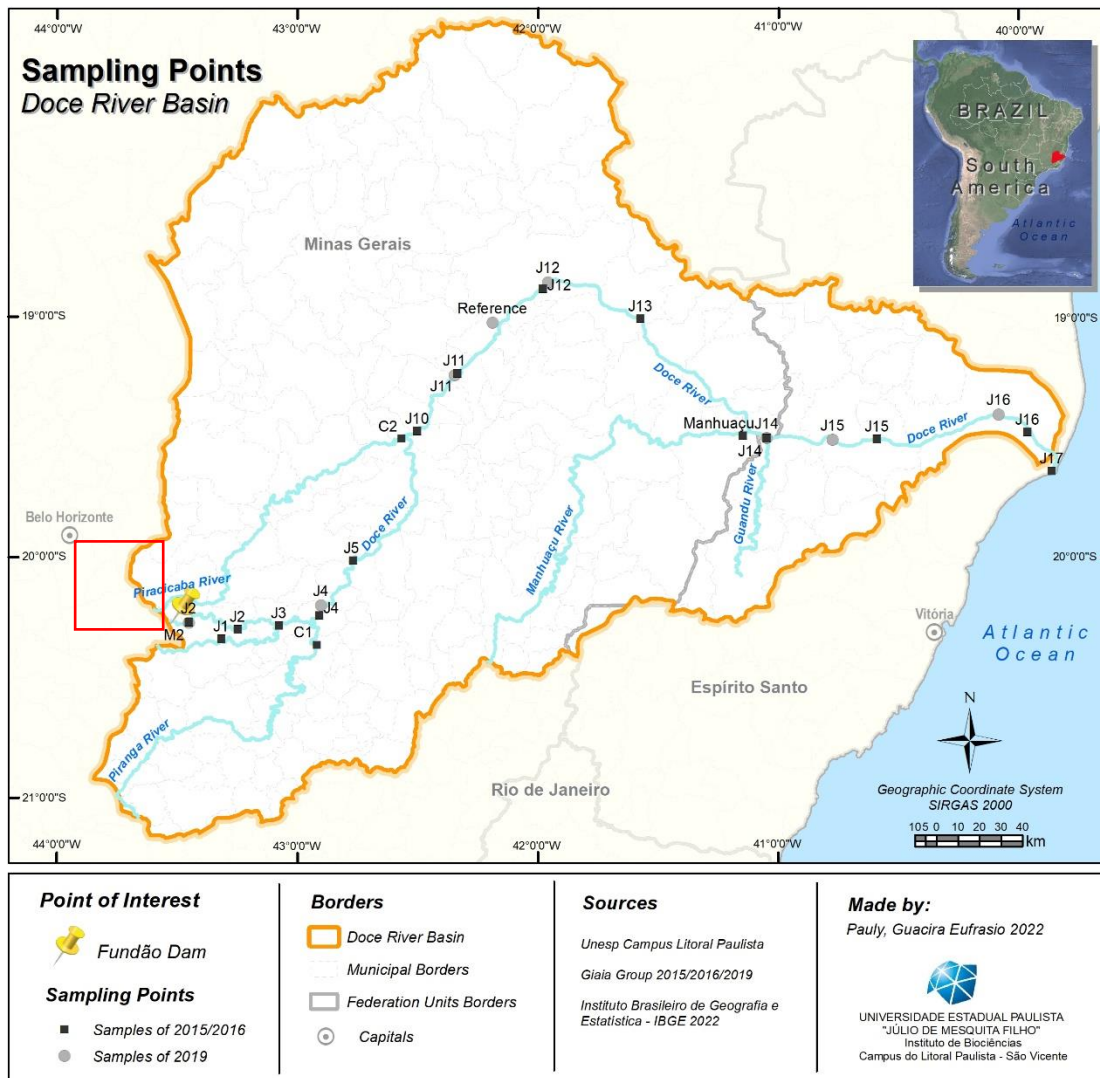


Figure 1 - Map of the Rio Doce Basin. Sampling sites represented by black squares are surveys carried out in 2015 and 2016. Gray circles represent the samplings sites from the 4th and 5th surveys. Square in red locates IQ.

Table S1 - Geographical coordinates of the water and sediment sampling sites during the first, second and third sampling surveys.

Sampling site	Description	Geographical Coordinates	
M2	Gualaxo do Norte River – upstream of Fundão Dam (MG)	-20,27638884	-43,43115158
J1	Carmo River – upstream of the Gualaxo do Norte river mouth (MG)	-20,34691667	-43,29602778
J2	Gualaxo do Norte River (Paracatu de Baixo, MG)	-20,30644669	-43,22620446
J3	Carmo River, downstream of the Gualaxo do Norte river mouth (Barra Longa, MG)	-20,29086032	-43,05447547
C1	Piranga River (MG)	-20,37005555	-42,89536111
J4	Doce River, (Rio Doce, MG)	-20,24780556	-42,886
C2	Piracicaba River (MG)	-19,50922222	-42,54141944
J5	Doce River, at BR262 road (between Rio Doce and Ipatinga, MG)	-20,019819	-42,744726
J10	Doce River, (Ipatinga, MG)	-19,47686111	-42,47597222
C3	Santo Antônio River (MG)	-19,23446388	-42,32084722
J11	Doce River (Naque, MG)	-19,23683333	-42,30808333
J12	Doce River (Governador Valadares, MG)	-18,88313342	-41,95099862
J13	Doce River (Galiléia, MG)	-19,0065	-41,54252778
J14	Doce River (Baixo Guandu, ES)	-19,50714964	-41,01518824
C4	Guandu River (ES)	-19,518058333	-41,01417777
J15	Doce River (Colatina, ES)	-19,51063889	-40,55491667
J16	Doce River, at Maria Bonita farm (Linhares, ES)	-19,48075	-39,92561111
J17	Doce River mouth, (Regência, ES)	-19,64458499	-39,82405361
Reference	Manhuaçu River	-19.497.444.444	-41.115.138.888

Table S2 - Geographical coordinates of the water and sediment sampling sites during the fourth and fifth sampling surveys.

Ponto Amostral	Descrição do local	Coordenadas Geográficas (UTM)	
J2	Gualaxo do Norte River, (Bento Rodrigues, MG)	-20.279.138.888	-43.430.611.111
J4	Doce River, at Candonga Dam (Rio Doce, MG)	-20.206.694.444	-42.877.694.444
J11	Doce River (Naque, MG)	-1.924.375	-42.319.194.444
J12	Doce River (Governador Valadares, MG)	-18.856.111.111	-41.930.416.666
J14	Doce River (Baixo Guandu, ES)	-19.506.944.444	-41.014.861.111
J15	Doce River (upstream Colatina, ES)	-19.514.388.888	-40.739.361.111
J16	Doce River, (Linhares, ES)	-19.408.388.888	-400.465
REF	Corrente River (Periquito, MG)	-19.025.277.777	-42.160.361.111

Sedimentological analyzes

The sediment grain size distribution was analyzed following the standard L6.160 (CETESB, 1995). Each sample was lyophilized, and then aliquots up to 120 g were separated. The sediments were wet sieved through a 0.062 mm mesh, for separating the muddy (silt and clay) fraction. The material retained on the sieve was dried for 48h at 60°C, then macerated with the aid of a mortar and pestle, and finally sieved through a set of sieves mounted on a shaker for 20 minutes. The fractions retained on each sieve were weighed to obtain the sandy fractions. The textures the sediment samples were determined based on the Wentworth (1922) scale and classified according to Shepard (1954). The quantities of organic matter (OM) in the sediments were obtained following the loss-by-ignition method (Luczak et al., 1997). Basically, sediment aliquots (5g) were dried for 48h at 60°C and then incinerated for 4h at 500°C in a muffle. The OM contents were determined by the difference between the initial and final weights of each sample.

Chemical analyses

Water samples

Initially 50 ml of each water sample were aliquoted and preserved in sub-distilled HNO₃ for the analysis of total metals; a second set of 50 ml aliquots was also preserved in sub-distilled HNO₃ and filtered through a 45 µM membrane for analysis of dissolved metals. The concentrations of metals were measured

by the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), according to the protocol of USEPA 6020 (2014) (USEPA, 2014) and SMEWW 3125 B (1998).

Sediment samples

For the acid extraction, 1.0 g of each sediment sample was transferred to glass tubes, kept in a digester block at 95°. The sediments were partially digested using a mixture of HNO₃, HCl and H₂O₂, according to USEPA 3050B (USEPA, 1996), as detailed in Trevisani et al. (2016). Thus, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn were quantified by inductively coupled plasma optical spectrometry (ICP-OES). The concentrations obtained were compared to the legal standards for dredged sediments (Brasil, 2005), which define two levels of contamination: Level I, indicating threshold toxic values, and Level II, indicating probable toxic levels.

An SS-2 certified reference material (EnviroMAT Contaminated Soil, SCP Science) was analyzed using the same procedure. Table S3 presents the certified values, recovery and relative standard deviation of each analyzed element. All recoveries were within the 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.

Table S3 - Certified value (mg kg⁻¹) and result of mean $\pm$ standard deviation (SD), recovery and relative standard deviation (RSD) of SS-2 (n=3).

Element	Certified value	Mean $\pm$ SD	Recovery (%)	RSD (%)
Al	9548	10125 $\pm$ 679	106	6.9
As	3.36	4 $\pm$ 0,5	115	12.2
Cd*	0.91	1.2 $\pm$ 0.1	130	5.2
Cr	92.6	102 $\pm$ 8	110	7.8
Cu	120	123 $\pm$ 5	102	4.3
Fe	23083	23118 $\pm$ 785	100	3.0
Ni	25.1	24 $\pm$ 1	96	5.0
Pb	244	219 $\pm$ 10	90	4.5
Zn	281	289 $\pm$ 22	106	7.7

* informative value

Table S4 - Analytical limits of quantification (LOD) for metals in sediments from DRB, for metals in water from DRB.

Element	LOD (mg/L)
Al	0,031
As	0,044
Cd	0,008
Co	0,001
Cu	0,015
Cr	0,010
Fe	0,007
Mn	0,009
Ni	0,019
Pb	0,032
Zn	0,032

Table S5 - Analytical limits of quantification (LOQ) for metals in sediments from DRB.

Element	LOQ (mg/kg)
Al	1,56
As	2,22
Cd	0,42
Cu	0,78
Cr	0,50
Fe	0,37
Mn	0,48
Ni:	0,99
Pb	1,64
Zn	1,6

Geoaccumulation Index (Igeo) and Enrichment Factor (EF)

Müller (1979) proposed a geochemical index to assess the quality of sediments, the Igeo – geoaccumulation index, which ranks the sediments into 6 classes according to the sediment pollution, as shown in table S6. The Igeo has the formula (1):

$$(1) I_{geo} = \log_2(C_n/B_n * 1.5)$$

where C_n is the metal concentration in the sediment sample; and B_n is the background value for the sample location.

Table S6 - Geoaccumulation Index (Igeo). Classification of sediments according to the Igeo class. Source: Müller (1979).

Igeo values	Igeo classes	Sediment classification
>5	6	Extremely contaminated
4-5	5	Highly contaminated to extremely contaminated
3-4	4	Highly contaminated
2-3	3	Moderately contaminated to highly contaminated
1-2	2	Moderately contaminated
0-1	1	Free of contamination to moderately contaminated
0	0	Free from contamination

In their turn, the enrichment factor (EF) uses the Al as a normalizer, and can be calculated using the formula (2). The classification of EF values, according to Fühner (1989) is explained in table S7. For the Igeo and EF calculations, the background values for As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn and Al were extracted from Vicq et al. (2015) and for Fe such values were proposed by Rodrigues et al (2014).

$$(2) EF: (C_i/C_n)_{sample} / (C_b/C_n)_{background}$$

where C_i is the concentration of the metal in the sample, C_b is the reference value of that same metal, C_n is the value of the concentration of the normalizing element (Al) both in the sample and the reference value:

Table S7 - Sediment classification values according to the enrichment factor (EF).

Value of EF	Level of Enrichment
EF < 1	Mineral Enrichment
1 < EF < 5	Moderate Enrichment
5 < EF < 20	Significant Enrichment
20 < EF < 40	High Enrichment
EF > 40	Extremely High Enrichment

Toxicity test with *D. similis* and *D. magna*

Acute toxicity tests with *Daphnia similis* and *D. magna* were performed based on the standards of the Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 12713, 2016). The toxicity tests with the water and sediment samples of the first four sampling surveys were conducted with neonates of *D. similis*, while the tests with waters and sediments from the fifth survey and sediments from the fourth survey were conducted with neonates of *D. magna*. The reason for altering the test-organism was the availability of stable cultures. Anyway, such change does not introduce interferences on the results interpretation, because *D. similis* and *D. magna* present similar sensitivities to metals (Rodgher et al., 2010)

The tests performed with water samples were set up using 20 ml glass tubes, containing 10 ml of sample, while in the tests with sediment-water interface (SWI), 2 g of sediment from each sampling site and 10 ml of dilution water were added to the test tubes; the dilution water used was the same water to breed *D. similis*. Four replicates were prepared for each sample. Five organisms (24h old neonates) were introduced into each replicate (totaling 20 animals per treatment) and exposed for 48h to water or SWI. The tests were performed within a chamber under controlled conditions: photoperiod of 16h:8h (light/dark), temperature of 24°C (± 2°C), and lack of supplementary food. The physical-chemical parameters (pH and dissolved oxygen) were measured at the beginning and end of the tests. Concomitantly with the toxicity test, a test with a reference substance (potassium chloride - KCl) was performed (ABNT, 2016; USEPA, 2002), to allow the comparison of the tested organisms. At the end of the 48-hour period, the immobility of the organisms was counted and compared with their respective controls using the student t'-test. Pearson correlation between metal concentrations in sediments from each collection and toxicity results were calculated using the Paleontological Statistical software - PAST (Hammer et al., 2001).

Results

Chemical analyses of water

In the first sampling survey the levels of As, Cd, Mn and Ni in the whole samples exceeded the legal standards (Brasil, 2005) in most of samples. The highest As concentration was observed in J3, in the

Upper DRB, followed by J16, in the Lower DRB (table S8). Cd and Ni concentrations exceeded the legal standards in most of samples, with exception of J2 and J10 for Cd, and M2, J1 and J2 for Ni. Mn was above permitted levels in all 16 samples collected downstream of the dam, with the highest concentration at J2. Cr and Pb showed levels above the legislation only in J2, J10 and J13. and J2, J4, J5 and J12, respectively. Dissolved Al exceeded the standards only in J13 while total Al were above the standards in J13 and J10. No Co concentrations above permitted levels were observed. Dissolved Fe concentrations were below the standards, while total Fe exceeded such values in J10 and J2.

Table S8 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples collected in the 1st sampling survey. Values in red indicate levels above that allowed by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Amostra	As	Cd	Co	Cr	Mn	Ni	Pb	Fe-diss	Fe-tot	Al-diss	Al-tot
CONAMA	0,01	0,001	0,05	0,05	0,1	0,025	0,01	0,3	-	0,1	-
M2	0,018	0,005	0,005	<LOD	0,41	0,02	<LOD	0,046	0,47	0,03	0,15
J1	0,04	0,007	0,007	<LOD	1,94	0,02	<LOD	0,042	3,12	<0,02	1,56
J2	0,05	<0,001	<LD	0,14	5,29	0,014	0,029	0,037	66,3	<0,02	10,97
J3	0,11	0,005	0,006	<LOD	0,96	0,06	<LOD	0,038	15,83	0,042	4,58
J4	<LOD	0,003	0,004	0,04	2,19	0,04	0,013	0,103	31,1	<0,02	6,53
J5	<LOD	0,004	0,004	<LOD	1,2	0,06	0,01	0,071	23,96	<0,02	5,66
J10	<LOD	<0,001	<LOD	0,16	2,6	0,04	<LOD	0,079	93,74	0,026	15,77
J11	<LOD	0,004	0,005	<LOD	1,21	0,05	<LOD	0,043	25,49	<0,02	8,6
J12	0,04	0,003	0,004	0,04	1,26	0,05	0,015	0,141	15,86	0,03	6,05
J13	0,03	0,004	0,004	0,07	1,06	0,06	<LOD	0,27	26,37	0,21	20,54
J14	0,01	0,007	0,007	<LOD	0,11	0,04	<LOD	-	4,4	-	6
J15	0,014	0,005	0,006	<LOD	0,1	0,07	<LOD	0,058	3,77	<0,02	3,19
J16	0,072	0,005	0,005	<LOD	0,24	0,06	<LOD	0,05	4,68	0,051	3,5
J17	0,02	0,007	0,007	<LOD	0,16	0,05	<LOD	-	4,28	-	4,16

<LOD: Below the detection limit of the method.

In the 2nd sampling survey, the As concentrations showed values above the standards in C1, C2 and C3, where there was no influence of the tailings released by the rupture. Mn showed levels exceeded legal standards in all samples from the Upper and Middle DRB. J2 and J10 exhibited the highest total Fe concentrations, despite they were lower when compared to the first sampling survey; but in J10, the levels of dissolved Fe were above those legal standards (table S9).

Table S9 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples collected in the 2nd campaign. Values in red indicate levels above that allowed by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Amostra	As	Cd	Co	Cr	Mn	Ni	Pb	Fe-diss	Fe-tot	Al-diss	Al-tot
CONAMA	0,01	0,001	0,05	0,05	0,1	0,025	0,01	0,3	-	0,1	-
M2	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,235	<LOD	<LOD	<0,01	0,32	<0,02	0,062
J1	0,022	<0,001	<LOD	<LOD	0,819	<LOD	<LOD	0,08	0,67	0,02	0,16
J2	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,573	<LOD	<LOD	<0,01	17,96	<0,02	2,85
J3	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,21	<LOD	<LOD	<0,01	>18	<0,02	0,79
J4	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,236	<LOD	<LOD	0,015	7,66	<0,02	1,67
J5	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,348	<LOD	<LOD	<0,01	13,49	<0,02	1,67
J10	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,279	<LOD	<LOD	0,65	11,65	0,26	2,28
J11	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,142	<LOD	<LOD	<0,01	6,69	<0,02	2,27
J12	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,104	<LOD	<LOD	<0,01	6,36	<0,02	2,16
J13	<LOD	<0,001	<LOD	<LOD	0,810	<LOD	<LOD	0,11	3,99	0,057	1,56
J14	0,006	0,001	<LOD	<LOD	0,029	<LOD	<LOD	<0,01	1,48	<0,02	0,77
J15	0,004	<0,001	<LOD	<LOD	0,015	<LOD	<LOD	<0,01	1,28	<0,02	0,81
J16	0,005	<0,001	<LOD	<LOD	0,048	<LOD	<LOD	0,15	2,05	0,068	0,81
J17	0,008	0,001	<LOD	<LOD	0,027	<LOD	<LOD	<0,01	1,33	<0,02	0,93
C1	0,012	<0,002	<LOD	<LOD	0,024	<LOD	<LOD	<0,01	1,82	<0,02	0,93
C2	0,02	<0,002	<LOD	<LOD	0,05	<LOD	<LOD	<0,01	1,11	<0,02	0,68
C3	0,012	<0,002	<LOD	<LOD	0,024	<LOD	<LOD	-	1,21	-	0,84
C4	0,003	<0,002	<LOD	<LOD	0,03	<LOD	<LOD	<0,01	1,93	<0,02	0,98

<LOD: Below the detection limit of the method.

In the 4th sampling (2019), conducted in the rainy season, all samples showed total Fe levels above the legal standards; J14 and J15 had concentrations almost 5 times higher than that established by CONAMA (Table S10). The concentrations of Al also exceeded the legal standards in all samples, with higher rates in J15 and J16. The concentrations of the other analyzed metals were below the legal values, with exception of Mn, in J2.

Table S10 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples from the 4th sampling survey. Values in red indicate levels above the standards established by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Amostra	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
CONAMA	0,01	0,001	0,05	0,009	0,1	0,025	0,01	0,18	0,3	0,1
J2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,41	<LOD	<LOD	0,01	0,28	0,12
J4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,04	<LOD	<LOD	0,01	0,92	0,19
J11	<LOD	<LOD	0,007	<LOD	0,09	<LOD	<LOD	0,02	0,97	0,43
J12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,03	<LOD	<LOD	0,01	0,76	0,44
J14	0,01	<LOD	<LOD	0,006	0,06	<LOD	<LOD	0,01	1,47	0,37
J15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,04	<LOD	<LOD	0,01	1,41	1,34
J16	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,04	<LOD	<LOD	0,01	0,93	2,18
REF	<LOD	<LOD	0,03	0,03	0,035	0,06	<LOD	0,01	1,07	0,44

<LOD: Below the detection limit of the method.

In the 5th sampling survey, fewer values above the legal standards were observed. In J11, the concentrations of total Fe and Al levels were above the limits, although lower than those found in the 4th sampling survey. The J12's water also showed slightly higher levels of Al-tot when compared to levels allowed by law, and lower than those found in the 4th sampling, but at that same point, Fe-tot levels were acceptable (Yamamoto et al., 2022).

Table S11 - Concentration (mgL⁻¹) of metals in water samples collected in the 5th sampling survey. Values in red indicate levels above that allowed by current legislation for class II fresh water (CONAMA 357/2005).

Amostra	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
CONAMA	0,01	0,001	0,05	0,009	0,1	0,025	0,01	0,18	0,3	0,1
J2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,13	<LOD	<LOD	0,01	0,12	0,04
J4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,03	<LOD	<LOD	0,01	0,26	0,05
J11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,05	<LOD	<LOD	0,02	0,40	0,20
J12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,02	<LOD	<LOD	0,01	0,15	0,12
J14	0,01	<LOD	<LOD	<LOD	0,03	<LOD	0,01	0,02	0,09	0,07
J15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,02	<LOD	<LOD	0,01	0,12	0,08
J16	<LOD	<LOD	<LOD	0,01	0,04	<LOD	<LOD	0,01	0,23	0,08
REF	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,03	<LOD	<LOD	0,01	0,52	0,12

<LOD: Below the detection limit of the method.

Sediment properties

Sediments from the first sampling survey were composed predominantly by silt and clay (Table S12), with exception of M2 sediment (collected upstream of the dam) which showed a predominance of very gross sand, and J14, with predominance of medium sand. The organic matter content was higher at point J16, located in the Lower DRB.

Table S12 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 1st sampling survey (Dec 2015). Silt and clay < 63µm; Very fine sand (VFS) ≥ 63µm; Fine sand (FS) ≥ 125µm; Medium sand (MS) ≥ 250µm; Coarse sand (CS) ≥ 500µm; Very coarse sand (VCS) ≥ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Sampling site	< 63 µm Silt/Clay	63 µm VFS	125 µm FS	250 µm MS	500 µm CS	1 mm VCS	OM (%)
M2	3,95	13,14	19,14	15,78	9,34	38,65	2,17
J1	47,41	39,29	10,9	1,82	0,57	0	0
J3	46,69	47,74	5,56	0	0	0	0,76
J4	39,92	1,55	5,8	10,41	12,38	29,94	0
J5	75,28	21,99	1,66	0,69	0,31	0,06	2,96
J10	96,84	2,55	0,51	0,1	0	0	4,21
J12	99,37	0,27	0,2	0,08	0,04	0,04	11,55
J13	60,11	29,36	8,19	1,08	0,62	0,65	0,38
J14	11,49	3,46	23,96	51,18	17,75	2,48	0,2
J15	31,43	9,89	8,36	15,48	20,21	14,63	11,03
J16	81,83	11,63	3,19	1,93	1,03	0,37	14,45
J17	31,52	3,1	4,56	10,47	27,02	23,32	9,86

The sediments from the third campaign showed greater heterogeneity in terms of grain size distribution (Table S13). Sediments were predominantly sandy, and the samples collected closest to the Fundão dam showed a predominance of fine and very fine sand. Sediments from J5 and J11 had higher levels of silt and clay, while the other samples exhibited predominance of medium, coarse, or very coarse sands. In general, the quantities of mud (silt and clay) were smaller than those observed in the first sampling survey, the same occurring with the organic matter contents.

Table S13 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 3rd sampling survey (Oct/Nov 2016). Silt and clay < 63µm; Very fine sand (VFS) ≥ 63µm; Fine sand (FS) ≥ 125µm; Medium sand (MS) ≥ 250µm; Coarse sand (CS) ≥ 500µm; Very coarse sand (VCS) ≥ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Sampling site	< 63 µm Silt/Clay	63 µm VFS	125 µm FS	250 µm MS	500 µm CS	1 mm VCS	OM (%)
M2	3,91	19,59	32,95	22,04	11,53	9,98	0
J1	-	-	-	-	-	-	2,6
J2	15,53	61,79	14,58	4,52	2,66	0,92	1,36
J4	8,06	56,57	34,18	0,97	0,15	0,06	0
J5	54,52	44,98	0,48	0,01	0,01	0	2,08
J11	79,2	9,18	10,33	1,29	0	0	10,93
J12	2,38	4,35	9,34	19,7	27,98	36,24	1,48
J13	0,08	0,21	5,97	36,04	42,54	15,16	8,9
C1	2,18	9,89	34,15	38,65	14,3	0,84	-
C2	4,16	6,13	14,25	32,31	29,68	13,48	-
Manhuaçu	0,23	0,23	5	24,41	39,77	30,36	0,18

In the 4th sampling survey, the texture of sediments showed a predominance of fine and very fine sands (table S14), and only the sediment from J11 showed a predominance of silt and clay. The organic matter contents were similar among samples, and higher than those found in the previous sampling.

Table S14 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 4th sampling survey (Jan/Feb 2019). Silt and clay < 63µm; Very fine sand (VFS) ≥ 63µm; Fine sand (FS) ≥ 125µm; Medium sand (MS) ≥ 250µm; Coarse sand (CS) ≥ 500µm; Very coarse sand (VCS) ≥ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Sampling site	< 63 µm Silt/Clay	63 µm VFS	125 µm FS	250 µm MS	500 µm CS	1 mm VCS	OM (%)
J2	7,26	10,91	45	22,47	8,98	5,39	5,24
J4	31,96	48,57	19,15	0,21	0,06	0,04	5,21
J11	36,92	3,81	6,31	20,96	23,59	8,41	5,26
J12	14,43	19,17	26,36	6,76	9,19	24,09	5,46
J14	22,56	8,32	26,56	25,48	14,61	2,47	5,6
J15	6,8	9,45	24,44	21,52	26,12	11,67	5,48
J16	10,49	9,92	25,09	20,62	18,93	14,95	5,37
REF	69,11	9,45	8,76	4,28	5,97	2,43	6,25

In the fifth sampling survey (Table S15), the sediments were predominantly sandy, with medium sands in J14, and very fine sands in J15. In J12, the sediment was muddy, differing from the previous survey when the sediments were composed mainly of fine sand. The organic matter content of these sediments collected 3.5 years after the rupture showed uniform values, very similar to those observed in the previous sampling survey.

Table S15 - Sediment grain size distribution and percentage of organic matter of sediments from the 5th sampling survey (Jul/Aug 2015). Silt and clay < 63µm; Very fine sand (VFS) ≥ 63µm; Fine sand (FS) ≥ 125µm; Medium sand (MS) ≥ 250µm; Coarse sand (CS) ≥ 500µm; Very coarse sand (VCS) ≥ 1mm. Values in bold represent the predominant fraction in each sample.

Sampling site	< 63 µm Silt/Clay	63 µm VFS	125 µm FS	250 µm MS	500 µm CS	1 mm VCS	OM (%)
J2	8,52	18,24	37,34	19,6	9,6	6,69	5,25
J4	15,13	25,95	19,45	13,95	14,96	10,56	5,35
J11	28,86	13,81	7,2	24,41	21,24	4,47	5,36
J12	41,47	25,23	23,97	6,53	1,53	1,28	5,81
J14	12,55	6,41	16,11	30,89	27,74	6,29	5,42
J15	23,88	35,23	33,5	6,16	0,59	0,63	5,5
J16	4,9	6,36	32,99	22,14	23,65	9,96	5,24
REF	41,66	20,18	18,05	10,74	6,12	3,25	6,9

Sediment Chemistry

Chemical analyzes of sediments from the first sampling showed concentrations above the CONAMA's Level II for As in M2, while sediments from J12, J13, J16 and J17 had concentrations above Level I (Table S16). M2 sediments also exhibited Mn concentrations above the background values. In their turn, sediments from J1, J5 and J10 had concentrations above Level I for Cd. The sediment from J12 presented concentrations exceeding Level I for As, Cd, and Cr, and above the background for Mn, Fe and Al. In the sediments from J13 the concentrations of As and Cd exceeded Level I and Al was above background. Sediments from J15 and J16 presented Al concentrations above background and Cr above Level 1; in J16, level 1 was also exceeded for As and Cd. J17 presented As, Cd and Cu above Level I.

Table S16 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in the sediment samples collected in the 1st sampling survey (Dec 2015). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Sample	Element analyzed									
	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
Level 1	5.9	0.6	37.3	35.7	-	18	35	123	-	-
Level 2	17	3.5	90	197	-	35.9	91.3	315	-	-
Background	18.1	1.1	133	23	1580	38	23	51	82000	23000
M2	27.15	1.73	13.19	12.43	9056.7	7.95	5.37	15.89	91602.2	4088.8
J1	3.08	0.86	6.83	1.61	184.9	2.17	2.30	7.13	51980.7	895.7
J2	2.74	0.35	30.6	10.32	105.1	4.79	3.75	14.7	23224.75	8470.7
J3	2.60	0.51	4.87	1.71	88.0	1.70	1.99	6.17	31203.9	1273.7
J4	5.47	<LOQ	5.06	1.99	97.2	2.35	<LOQ	6.11	19012.6	1187.5
J5	5.70	0.75	22.62	8.12	306.6	7.67	7.57	19.61	43530.5	7726.8
J10	5.29	1.09	29.92	10.55	439.5	8.96	5.50	24.05	56340.4	10839.1
J12	<i>10.07</i>	<i>1.83</i>	<i>61.35</i>	<i>23.72</i>	2248.7	16.45	15.40	49.90	98641.8	24658.3
J13	<i>9.84</i>	<i>0.60</i>	32.46	13.13	297.3	13.70	11.68	52.63	42821.6	33485.7
J14	<LOQ	<LOQ	5.16	1.38	28.4	1.28	<LOQ	5.55	5129.5	2092.7
J15	4.34	0.56	<i>40.49</i>	13.65	264.1	13.36	10.64	45.01	48381.8	35822.9
J16	<i>6.87</i>	<i>0.73</i>	<i>50.81</i>	17.82	228.4	15.91	15.01	59.93	48937.1	36810.5
J17	9.65	<i>0.70</i>	34.81	<i>73.70</i>	140.8	9.57	15.80	102.27	44235.3	21675.0

Background values given by Vicq et al. (2015), with exception of Fe, proposed by Rodrigues et al. (2014).

According to the Igeo, the sediments of the 1st sampling survey showed low to moderate contamination by metals and As (Table 1). The Igeo values indicated moderate contamination of Mn in sediments from M2 and Cu in sediments from J17. In general, the EF values suggested mineral to moderate enrichment by metals in sediments from DRB (Table 2). The EF indicated significant enrichment of As, Cd, and Fe, and high enrichment of Mn in M2, high enrichment of Cd and significant enrichment of Fe in J1, significant enrichment of Cd and Fe in J3 and significant enrichment of As in J4.

Table 1 - Igeo values for sediments collected in the 1st campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Amostra	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
M2	0,00	0,07	-3,92	-1,47	1,93	-2,84	-2,68	-2,27	-0,43	-3,08
J1	-3,14	-0,94	-4,87	-4,42	-3,68	-4,72	-3,91	-3,42	-1,24	-5,27
J2	-3,31	-2,24	-2,70	-1,74	-4,50	-3,57	-3,20	-2,40	-2,40	-2,03
J3	-3,38	-1,69	-5,36	-4,33	-4,75	-5,07	-4,12	-3,63	-1,98	-4,76
J4	-2,31	-	-5,30	-4,12	-4,61	-4,60	-	-3,65	-2,69	-4,86
J5	-2,25	-1,14	-3,14	-2,09	-2,95	-2,89	-2,19	-1,96	-1,50	-2,16
J10	-2,36	-0,60	-2,74	-1,71	-2,43	-2,67	-2,65	-1,67	-1,13	-1,67
J12	-1,43	0,15	-1,70	-0,54	-0,08	-1,79	-1,16	-0,62	-0,32	-0,48
J13	-1,46	-1,46	-2,62	-1,39	-2,99	-2,06	-1,56	-0,54	-1,52	-0,04
J14	-	-	-5,27	-4,64	-6,38	-5,48	-4,97	-3,78	-4,58	-4,04
J15	-2,65	-1,56	-2,30	-1,34	-3,17	-2,09	-1,70	-0,77	-1,35	0,05
J16	-1,98	-1,18	-1,97	-0,95	-3,37	-1,84	-1,20	-0,35	-1,33	0,09
J17	-1,49	-1,24	-2,52	1,10	-4,07	-2,57	-1,13	0,42	-1,48	-0,67

Table 2 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 1st sampling survey. FE < 1: Mineral enrichment; 1 < FE < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

EF	Al	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe
M2	Normalizer element	8,44	8,85	0,56	3,04	32,24	1,18	1,31	1,75	6,28
J1		4,37	20,15	1,32	1,79	3,01	1,47	2,57	3,59	16,28
J2		0,41	0,86	0,62	1,22	0,18	0,34	0,44	0,78	0,77
J3		2,59	8,30	0,66	1,34	1,01	0,81	1,56	2,19	6,87
J4		5,86	-	0,74	1,68	1,19	1,20	-	2,32	4,49
J5		0,94	2,04	0,51	1,05	0,58	0,60	0,98	1,14	1,58
J10		0,62	2,09	0,48	0,97	0,59	0,50	0,51	1,00	1,46
J12		0,52	1,55	0,43	0,96	1,33	0,40	0,62	0,91	1,12
J13		0,37	0,37	0,17	0,39	0,13	0,25	0,35	0,71	0,36
J14		-	-	0,43	0,66	0,20	0,37	-	1,20	0,69
J15		0,15	0,32	0,20	0,38	0,11	0,23	0,30	0,57	0,38
J16		0,24	0,42	0,24	0,48	0,09	0,26	0,41	0,73	0,37
J17		0,57	0,68	0,28	3,40	0,09	0,27	0,73	2,13	0,57

In the 3rd sampling survey (Table S17), As showed concentration above Level I in sediments from J11, while in M2 as the concentration exceeded Level II and Mn exceeded the background values. Cd concentrations above Level I were reported for the sediments from M2, J1 and J11. Cr showed concentrations above Level I in C2. In this sampling survey the metals concentrations were generally lower when compared to concentrations measured in the first campaign, with few exceptions, such as As for J1. The Igeo of sediments collected in the 3rd sampling survey indicated low contamination by metals (Table 3), except for Mn in sediments from M2 and As in sediments from J1. Based on EF values, the sediments from the 3rd sampling survey presented mineral to moderate enrichment (Table 4). In M2, the EF indicated significant enrichment for As, Cd, and Cu, and high enrichment for Mn. The sediments from J1 showed high enrichment for As. Sediments from J2 and J5 were significantly enriched with Fe; J5 was also significantly enriched with Cd.

Table S17 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in the sediment samples collected in the 3rd sampling survey (Oct/Nov 2016). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Sample	Element analyzed									
	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
Level 1	5.9	0.6	37.3	35.7	-	18	35	123	-	-
Level 2	17	3.5	90	197	-	35.9	91.3	315	-	-
Background	18.1	1.1	133	23	1580	38	23	51	82000	23000
M2	23.58	1.22	12.79	20.29	6862.4	8.78	5.13	16.22	61118.0	3906.1
J1	76.85	0.66	31.32	6.23	448.6	6.85	3.09	13.76	38814.2	4649.5
J2	<LOQ	<LOQ	4.79	2.79	261.5	2.29	1.65	8.36	22551.1	1248.8
J4	<LOQ	<LOQ	2.28	1.56	72.9	1.31	<LOQ	5.38	7971.5	600.9
J5	2.32	0.49	4.39	1.69	61.6	1.76	1.70	6.45	29020.3	1449.6
J11	9.18	0.65	35.09	12.09	236.5	10.33	9.99	38.27	42573.8	30285.7
J12	<LOQ	<LOQ	17.38	8.44	112.7	6.51	4.68	27.44	18700.8	9860.4
J13	<LOQ	<LOQ	9.01	1.54	82.1	2.47	1.16	8.06	4788.3	1816.3
C1	<LOQ	<LOQ	22.27	7.71	63.2	7.76	3.18	22.77	12288.1	7327.3
C2	3.47	<LOQ	39.92	5.35	74.0	11.26	4.74	53.60	19758.8	6785.4
Manhuaçu	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.97	33.06	<LOQ	<LOQ	4.77	3216.37	2535.27

Background values given by Vicq et al. (2015), with exception of Fe, proposed by Rodrigues et al. (2014).

Table 3 - Igeo values for sediments collected in the 3rd campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Amostra	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
M2	-0,20	-0,44	-3,96	-0,77	1,53	-2,70	-2,75	-2,24	-1,01	-3,14
J1	1,50	-1,32	-2,67	-2,47	-2,40	-3,06	-3,48	-2,47	-1,66	-2,89
J2	-	-	-5,38	-3,63	-3,18	-4,64	-4,39	-3,19	-2,45	-4,79
J4	-	-	-6,45	-4,47	-5,02	-5,44		-3,83	-3,95	-5,84
J5	-3,55	-1,75	-5,51	-4,35	-5,27	-5,02	-4,34	-3,57	-2,08	-4,57
J11	-1,56	-1,34	-2,51	-1,51	-3,32	-2,46	-1,79	-1,00	-1,53	-0,19
J12	-	-	-3,52	-2,03	-4,39	-3,13	-2,88	-1,48	-2,72	-1,81
J13	-	-	-4,47	-4,49	-4,85	-4,53	-4,89	-3,25	-4,68	-4,25
C1	-	-	-3,16	-2,16	-5,23	-2,88	-3,44	-1,75	-3,32	-2,24
C2	-2,97	-	-2,32	-2,69	-5,00	-2,34	-2,86	-0,51	-2,64	-2,35
Manhuaçu	-	-	-	-5,15	-6,16	-	-	-4,00	-5,26	-3,77

Table 4 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 3rd campaign. Values where EF < 1: Mineral enrichment; 1 < EF < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

EF	Al	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe
M2	Normalize element	7,67	6,53	0,57	5,19	25,57	1,36	1,31	1,87	4,39
J1		21,00	2,97	1,16	1,34	1,40	0,89	0,66	1,33	2,34
J2		-	-	0,66	2,23	3,05	1,11	1,32	3,02	5,07
J4		-	-	0,66	2,60	1,77	1,32	-	4,04	3,72
J5		2,03	7,07	0,52	1,17	0,62	0,73	1,17	2,01	5,62
J11		0,39	0,45	0,20	0,40	0,11	0,21	0,33	0,57	0,39
J12		-	-	0,30	0,86	0,17	0,40	0,47	1,26	0,53
J13		-	-	0,86	0,85	0,66	0,82	0,64	2,00	0,74
C1		-	-	0,53	1,05	0,13	0,64	0,43	1,40	0,47
C2		0,65	-	1,02	0,79	0,16	1,00	0,70	3,56	0,82
Manhuaçu		-	-	-	0,38	0,19	-	-	0,85	0,36

In the 4th sampling survey (2019's rainy season – Table S18), As concentrations above Level II were reported in sediments from J2, while sediments from J4 and J11 presented concentrations exceeding Level I. Cd was above Level I in sediments from J2, J4, J11 and reference (REF). Concentrations of Mn were above background in J2, while the sediment from REF presented Al above the background. In the 4th sampling survey, Igeo values indicated moderate contamination of Mn in sediments from J2 for Mn (Table 5). Besides, sediments from J2 presented EF with values indicating significant enrichment for As, Cd, and Cu, and high enrichment for Mn (Table 6).

Table S18 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in sediment samples collected in the 4th sampling survey (summer 2019). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Sample	Element analyzed									
	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
Level 1	5.9	0.6	37.3	35.7	-	18	35	123	-	-
Level 2	17	3.5	90	197	-	35.9	91.3	315	-	-
Background	18.1	1.1	133	23	1580	38	23	51	82000	23000
J2	29.07	<i>1.54</i>	16.49	26.98	8546.4	13.94	8.92	18.96	63919.8	4713.6
J4	<i>6.20</i>	<i>0.71</i>	18.14	7.15	309.1	7.14	4.84	17.77	35743.7	11432.6
J11	<i>7.58</i>	<i>0.70</i>	31.94	6.34	348.5	9.92	5.86	25.70	38465.4	9426.8
J12	3.84	0.43	21.27	6.91	125.7	6.59	8.25	25.20	20543.5	12434.4
J14	<LOQ	0.50	24.49	6.82	256.4	7.38	7.73	26.14	27520.1	18902.6
J15	3.60	<LOQ	14.53	3.55	94.4	5.38	3.97	16.89	17081.4	9258.5
J16	3.49	<LOQ	15.00	4.16	152.7	6.76	4.30	22.09	16694.2	10172.9
REF	4.84	<i>1.39</i>	24.32	14.01	465.3	7.22	28.23	69.58	67228.3	49931.0

Background values given by Vicq et al. (2015), with exception of Fe, proposed by Rodrigues et al. (2014).

Table 5 - Igeo values for sediments collected in the 4th campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Amostra	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
J2	0,10	-0,10	-3,60	-0,35	1,85	-2,03	-1,95	-2,01	-0,94	-2,87
J4	-2,13	-1,22	-3,46	-2,27	-2,94	-3,00	-2,83	-2,11	-1,78	-1,59
J11	-1,84	-1,24	-2,64	-2,44	-2,77	-2,52	-2,56	-1,57	-1,68	-1,87
J12	-2,82	-1,94	-3,23	-2,32	-4,24	-3,11	-2,06	-1,60	-2,58	-1,47
J14	-	-1,72	-3,03	-2,34	-3,21	-2,95	-2,16	-1,55	-2,16	-0,87
J15	-2,91	-	-3,78	-3,28	-4,65	-3,41	-3,12	-2,18	-2,85	-1,90
J16	-2,96	-	-3,73	-3,05	-3,96	-3,08	-3,00	-1,79	-2,88	-1,76

Table 6 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 4th campaign. Values where EF < 1: Mineral enrichment; 1 < EF < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

EF	Al	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe
J2	Normalize element	7,84	6,82	0,61	5,72	26,39	1,79	2,07	1,81	3,80
J4		0,69	1,30	0,27	0,63	0,39	0,38	0,46	0,70	0,88
J11		1,02	1,55	0,59	0,67	0,54	0,64	0,68	1,23	1,14
J12		0,39	0,72	0,56	0,30	0,46	0,15	0,32	0,91	0,39
J14		-	0,56	0,22	0,36	0,20	0,24	0,45	0,62	0,41
J15		0,49	-	0,27	0,38	0,15	0,35	0,47	0,82	0,52
J16		0,44	-	0,25	0,41	0,22	0,40	0,46	0,98	0,46
REF		0,12	0,58	0,08	0,28	0,14	0,09	0,62	0,63	0,38

Sediments from the 5th sampling survey (2019's dry period – Table S19) tended to exhibit increased concentrations of metals, and showed concentrations of As above Level II in J2, J4 and J11 and Al above Level I in J12, J15 and REF. The concentrations of Cd exceeded level 1 for most of samples, with exception of J14 and J16; in the sediments from J12, the concentration was also above the level 2. Cr showed concentrations above Level I in the samples from J11, J12 and J15, while sediments from J4, J11, and J12 presented Ni exceeding the level 1. The concentrations of Fe were above the background (Rodrigue et al., 2014) in J2 and REF and Al above the background in J11, J12, J15 and REF. Still in this sampling survey, Igeo values indicated high contamination by Mn in the sediment from J2, as well as moderate contamination for Cd and Fe (Table 7). The EF values indicated high enrichment of Cd and Mn and moderate enrichment of As, Ni and Fe in the sediment from J1 (Table 8). Most of the sediments showed levels of mineral enrichment.

Table S19 - Concentration of metals (mg kg⁻¹) in the sediment samples collected in the 5th sampling survey (winter 2019). Values in bold indicate levels above the Level 2 established by federal standards (CONAMA 454/2012), while values in italic show exceedances for the Level 1. For Mn, Al and Fe, values in bold indicate exceedances of regional backgrounds (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015).

Sample	Element analyzed									
	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
Level 1	5.9	0.6	37.3	35.7	-	18	35	123	-	-
Level 2	17	3.5	90	197	-	35.9	91.3	315	-	-
Background	18.1	1.1	133	23	1580	38	23	51	82000	23000
J2	47.76	5.14	16.38	14.51	11373.1	11.31	12.92	36.13	286494.3	4941.5
J4	26.71	1.31	28.13	23.03	1270.6	25.45	7.39	38.09	59277.2	20214.3
J11	17.40	1.56	54.93	15.96	1252.0	20.51	10.57	50.24	81969.9	27904.6
J12	13.05	1.91	65.61	22.78	452.3	23.24	20.27	83.23	76734.4	42707.0
J14	3.15	<LOQ	16.22	5.23	105.1	4.86	5.41	20.76	22167.8	16893.0
J15	6.75	0.72	37.87	12.07	203.7	15.22	10.36	49.95	40260.8	39474.6
J16	5.13	<LOQ	11.89	2.56	92.8	3.54	2.96	11.48	16145.8	7343.3
REF	5.90	1.58	28.77	17.27	870.8	9.30	32.70	85.67	85333.9	59276.0

Background values given by Vicq et al. (2015), with exception of Fe, proposed by Rodrigues et al. (2014).

Table 7 - Igeo values for sediments collected in the 5th campaign. 0: Free from contamination; 0-1: Free of contamination to moderately contaminated; 1-2: Moderately contaminated; 2-3: Moderately contaminated to highly contaminated; 3-4: Highly contaminated; 4-5: Highly contaminated to extremely contaminated; >5 Extremely contaminated.

Amostra	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
J2	0,81	1,64	-3,61	-1,25	2,26	-2,33	-1,42	-1,08	1,22	-2,80
J4	-0,02	-0,33	-2,83	-0,58	-0,90	-1,16	-2,22	-1,01	-1,05	-0,77
J11	-0,64	-0,08	-1,86	-1,11	-0,92	-1,47	-1,71	-0,61	-0,59	-0,31
J12	-1,06	0,21	-1,60	-0,60	-2,39	-1,29	-0,77	0,12	-0,68	0,31
J14	-3,11	-	-3,62	-2,72	-4,49	-3,55	-2,67	-1,88	-2,47	-1,03
J15	-2,01	-1,20	-2,40	-1,52	-3,54	-1,90	-1,74	-0,61	-1,61	0,19
J16	-2,40	-	-4,07	-3,75	-4,68	-4,01	-3,54	-2,74	-2,93	-2,23

Table 8 - Enrichment Factor (EF) values of sediments from the 5th campaign. Values where EF < 1: Mineral enrichment; 1 < EF < 5: Moderate enrichment; 5 < EF < 20: Significant enrichment; 20 < EF < 40: High Enrichment; EF > 40: Extremely High.

EF	Al	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe
J2	Normalize element	12,28	21,77	0,57	2,94	33,50	1,39	2,86	3,30	16,26
J4		1,68	1,35	0,24	1,14	0,91	0,76	0,40	0,85	0,82
J11		0,79	1,17	0,34	0,57	0,65	0,44	0,41	0,81	0,82
J12		0,39	0,93	0,27	0,53	0,15	0,33	0,52	0,88	0,50
J14		0,24	-	0,17	0,31	0,09	0,17	0,35	0,55	0,37
J15		0,22	0,38	0,17	0,31	0,08	0,23	0,29	0,57	0,29
J6		0,89	-	0,28	0,35	0,18	0,29	0,44	0,71	0,62
REF		0,13	0,56	0,08	0,29	0,21	0,09	0,60	0,65	0,40

Water toxicity

Toxicity test with water samples

The toxicity test with reference substance (KCl) for exposure test with *D. magna* to water and sediments of the 4th and 5th samples showed LC50 229.20 mgL⁻¹ (95% C.I.: 198.2 – 260.2). Regarding the tests with *D. similis*, the sensitivity of the cultures are continuously monitored monthly, and the EC50 were within the suitable ranges established by the control chart (EC50 = 329,68 ± 40,34). The toxicity test with water samples from the first sampling survey showed that only the sample from J12, located in the city of Governador Valadares, was acutely toxic. This sample presented concentrations of As, Cd, Mn, Ni and Pb above the legal standards, with Mn about 16 times higher than the acceptable limit (Figure 2a). In the 2nd sampling survey, most of water samples was significantly toxic in comparison to the control, with exception of the waters from J2, J4, J10 and J17 (Figure 2b). The samples from J1, J3, and J5 were the most toxic. The water from J1 presented the highest levels of As and Mn, with concentrations above the standards. Samples from J3, J5, J11, J12, and J13 presented Mn concentrations above acceptable levels.

Among the water samples collected three years after the collapse (i.e. 4th sampling survey), only those from J4 and J12 showed acute toxicity to *D. similis* (Figure 2c). Most of water samples collected in this survey showed levels of Fe and Al above the legal standards. In the 5th sampling survey, few samples could be tested due to quantity of sample available. Significant acute toxicity to *D. magna* was reported only for the samples from J4 and REF (Figure 2d). Concentrations of Fe and Al exceeding the legal standards were observed in the water collected in REF.

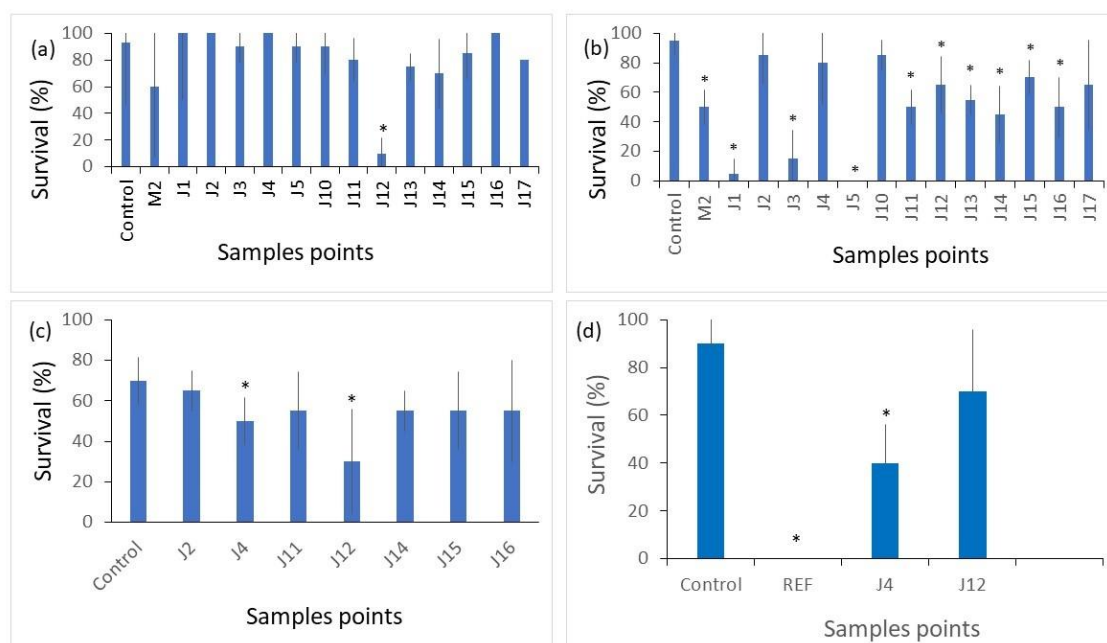


Figure 2 - Acute toxicity of water samples from the Doce River Basin to *Daphnia* spp. (a) Samples collected in the first sampling survey; (b) Samples collected in the second sampling survey; (c) Samples collected in the fourth sampling survey; (d) Samples collected in the fifth sampling survey Asterisk indicates significant toxicity ($p < 0.05$).

Sediment toxicity

In the first sampling survey sediments from J1, J2, J3, J4, J12, J13, J14, and J17 were significantly toxic to *D. similis* (Figure 3a). In the third sampling survey, toxicity was observed only in sediments from C2 and J11 (Figure 3b). In the 4th sampling survey, no sediments were significantly toxic (Figure 3c). Finally, in the 5th sampling survey, the sediments from J11, J12, and REF were considered toxic (Figure 3d). In general, the acute toxicity did not correlate with the concentrations of metals (Tables S20, S21, S22, and S23), with exception of Zn in the 3rd survey.

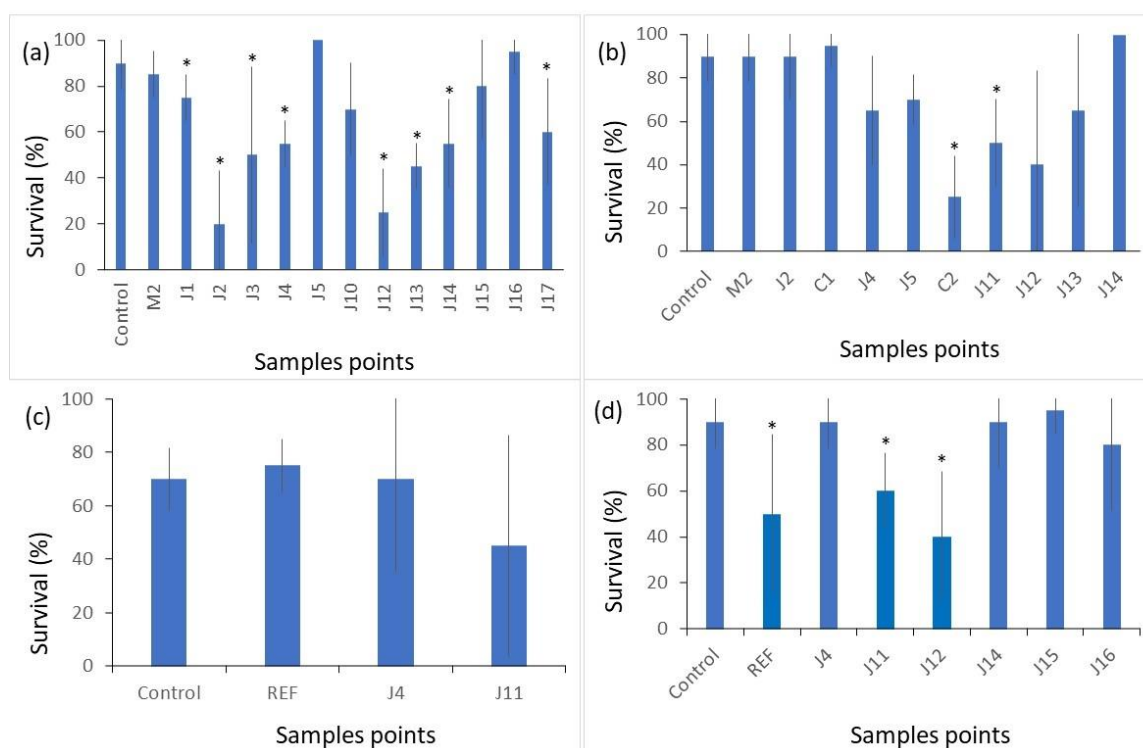


Figure 3 - Acute toxicity test of sediment samples from the Doce River Basin to *Daphnia* spp, based on sediment-water interface exposures. (a) Samples collected in the first sampling survey campaign; (b) Samples collected in the third sampling survey; (c) Samples collected in the fourth sampling survey; (d) Samples collected in the fifth sampling survey. Asterisk indicates significant toxicity ($p < 0.05$).

Table S20 - Person Linear Correlation of *D. similis* toxicity exposed in sediments from the 1st campaign. No correlation was observed between the occurrence of metals and toxicity of ISA assays.

	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al	Toxi % mor
As		0,009	0,677	0,439	1,84E-05	0,326	0,443	0,585	0,313	0,876	0,687
Cd	0,710		0,147	0,589	0,0063	0,128	0,260	0,66	0,0007	0,836	0,863
Cr	0,134	0,444		0,117	0,96047	1,56E-06	2,44E-05	0,0069	0,0050	0,0006	0,773
Cu	0,246	0,173	0,476		0,99489	0,192	0,0089	6,81E-05	0,386	0,188	0,735
Mn	0,923	0,735	-0,016	-0,002		0,696	0,995	0,715	0,379	0,600	0,708
Ni	0,310	0,464	0,953	0,404	0,126		5,36E-05	0,010	0,0128	8,11E-05	0,993
Pb	0,244	0,352	0,918	0,714	-0,001	0,904		3,31E-05	0,0325	0,0004	0,876
Zn	0,175	0,138	0,730	0,899	-0,117	0,703	0,913		0,224	0,0044	0,798
Fe	0,317	0,834	0,749	0,275	0,279	0,690	0,617	0,378		0,200	0,577
Al	0,050	0,066	0,841	0,407	-0,168	0,895	0,851	0,756	0,398		0,944
Toxi % mor	-0,129	0,055	0,0929	0,109	-0,120	-0,002	0,050	0,082	0,178	-0,022	

Table S21- Person Linear Correlation of *D. similis* toxicity exposed in sediments from the 3rd campaign. Significant positive linear correlation of Zn toxicity was observed (p=0,043).

	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al	Toxi % mor
As		0,114	0,234	0,428	0,366	0,848	0,712	0,907	0,151	0,980	0,549
Cd	0,503		0,487	0,001	0,007	0,604	0,095	0,685	2,18E-10	0,459	0,447
Cr	0,391	0,234		0,236	0,753	0,911	0,010	0,0004	0,433	0,032	0,104
Cu	0,266	0,827	0,389		0,010	0,962	0,013	0,230	0,0005	0,154	0,706
Mn	0,302	0,750	-0,107	0,730		0,496	0,663	0,673	0,006	0,689	0,304
Ni	-0,065	-0,176	0,037	-0,016	0,229		0,997	0,976	0,613	0,881	0,328
Pb	0,125	0,527	0,731	0,717	0,148	0,001		0,008	0,069	5,89E-05	0,342
Zn	-0,039	0,137	0,872	0,394	-0,143	-0,010	0,748		0,566	0,037	0,043
Fe	0,463	0,995	0,263	0,865	0,765	-0,171	0,565	0,194		0,409	0,536
Al	0,0082	0,249	0,645	0,460	-0,136	0,051	0,920	0,631	0,276		0,334
Toxi % mor	-0,231	-0,291	0,576	-0,146	-0,386	0,369	0,359	0,681	-0,238	0,364	

Table S22 - Person Linear Correlation of *D. magna* toxicity exposed in sediments from the 4th campaign. No correlation was observed between the occurrence of metals and toxicity of ISA assays.

	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al	Toxi % mor
As		0,042942	0,642	0,001	1,02E-05	0,0009	0,998	0,650	0,098	0,445	0,586
Cd	0,722		0,731	0,001	0,050	0,045	0,078	0,206	5,27E-06	0,322	0,358
Cr	-0,195	0,145		0,819	0,527	0,737	0,480	0,337	0,548	0,439	0,328
Cu	0,910	0,905	-0,096		0,0009	0,008	0,349	0,665	0,010	0,856	0,247
Mn	0,983	0,706	-0,263	0,926		0,002	0,952	0,676	0,116	0,497	0,643
Ni	0,926	0,715	0,141	0,845	0,893		0,963	0,771	0,079	0,513	0,622
Pb	0,001	0,653	0,293	0,382	0,025	0,019		5,82E-05	0,046	0,0005	0,221
Zn	-0,191	0,500	0,391	0,182	-0,176	-0,122	0,971		0,124	5,25E-05	0,217
Fe	0,624	0,987	0,251	0,830	0,598	0,652	0,715	0,589		0,209	0,410
Al	-0,316	0,402	0,320	0,077	-0,282	-0,272	0,938	0,972	0,497		0,388
Toxi % mor	0,251	0,411	0,435	0,505	0,215	0,228	0,529	0,533	0,372	0,389	

Table S23 - Person Linear Correlation of *D. magna* toxicity exposed in sediments from the 5th campaign. No correlation was observed between the occurrence of metals and toxicity of ISA assays

	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al	Toxi % mor
As		0,002	0,814	0,329	0,002	0,437	0,897	0,842	0,003	0,251	0,365
Cd	0,895		0,971	0,368	0,0003	0,710	0,511	0,669	1,26E-06	0,607	0,172
Cr	-0,099	-0,015		0,086	0,483	0,034	0,394	0,053	0,796	0,141	0,388
Cu	0,397	0,369	0,641		0,799	0,004	0,184	0,044	0,513	0,235	0,785
Mn	0,901	0,947	-0,291	0,107		0,896	0,928	0,778	4,92E-05	0,258	0,086
Ni	0,325	0,156	0,742	0,876	-0,055		0,779	0,246	0,885	0,518	0,939
Pb	-0,054	0,274	0,350	0,527	0,038	0,118		0,002	0,573	0,013	0,052
Zn	-0,084	0,179	0,698	0,719	-0,119	0,462	0,903		0,802	0,002	0,068
Fe	0,887	0,992	-0,109	0,272	0,972	0,061	0,236	0,105		0,532	0,708
Al	-0,460	-0,215	0,568	0,474	-0,454	0,269	0,817	0,891	-0,261		0,118
Toxi % mor	-0,83	0,963	0,819	0,329	-0,990	-0,095	0,996	0,994	0,441	0,982	

Discussion

The analyzes of water and sediment samples bring relevant information regarding geochemistry and toxicity, since they allow the evaluation of the space-time changes of the environmental quality in the DRB after the Fundão dam rupture. Changes in sediment properties and metal levels in both water and sediments after the release of tailings were identified immediately after the collapse, corroborating with Hatje et al (2017), who observed high levels of Al, Mn, and Fe increased in waters collected at the Doce River, exceeding the standards proposed by CONAMA 357/05 (Brasil, 2005), as well as increased levels of Cd, Cr, Ni, and Mn in sediments. Our results indicate that shortly after the arrival of the tailings, the highest levels of metallic elements in sediments were found in the Middle DRB. In the same way, IBAMA (2015) reported that the total concentrations of elements such as Al, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mn and Ni showed discrepancy with respect to legal standards and that dissolved Al-diss, Mn-diss and Fe-diss also presented alterations, suggesting bioavailability of these three elements. In another study, Costa et al. (2022) discussed the variations of metals levels in water and sediments of DRB, reporting presence of dissolved elements and bioaccumulation in a range of organisms such as fishes, plankton, shrimps, crabs, and other invertebrates. The authors also stated that bioaccumulation followed the space-temporal concentrations trends observed in water and sediments, evidencing some elements were bioavailable, as were the cases for Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn.

According to an IGAM (2015), there was a considerable increase in metal concentrations in the RD water composition after the arrival of the tailings, with high concentrations of Fe-diss (32.26 mgL^{-1}) and Mn (936 mgL^{-1}). The concentrations decreased during the following days of monitoring, with values similar to those obtained in the first sampling survey of this work. Segura et al. (2016) also reported high concentrations of Mn in waters collected in November 2015.

In the second sample survey, the metal concentrations were significantly reduced, in comparison to the previous survey, and for most elements the concentrations were below legal limits, with the exception of As and Mn, which levels remained high in the Upper and Medium DRB. Our results corroborate those of Richard et al (2020), who observed a drop in total As, Cr and Pb levels in water samples collected throughout the basin six months after the disaster. Using trained PLS-PM regression models for the disaster in the Paraopeba River (Brumadinho), which was very similar to the Fundão dam's event, Mendes et al. (2022) showed that in the rainy season, the water turbulence caused an increased release of arsenic from the sand fractions in the mine tailings. However, counteracting this negative effect, the increased river flow contributed to the dilution of contaminants. Thus, considering a similar condition at DRB, the resulting process would be the transport of metals downstream, with a reduction of levels along the Upper and Median DRB.

High concentrations of As, above the legal limit, were found in water samples from the reference areas (C1, C2 and C3), in the 2016 water samples. These results are similar to those of Hatje et al. (2017), who also observed the presence of Pb, Ni, Mn and Fe in regions not affected by the tailings, with Mn levels above legal parameters (0.124 mgL^{-1}) but lower than the highest levels found in our work, except for J12 (0.104 mgL^{-1}). Hatje et al. (2017) observed 0.08 mgL^{-1} of Fe-diss in water collected from the Piranga River, the control area of our study, equal to the concentration observed in J1, but above most of the samples in our study. However, even if the occurrence of some anomalies in the chemical analyzes is foreseen due to

the mineral richness of the region, there is a relationship between the high concentrations of As in aquatic compartments, even not affected by the tailings, due to centuries of exploration of Au in the DRB region (Hatje et al., 2017).

Despite the temporal trend of decreasing concentrations of metals, in the 4th sampling survey (2019's rainy season) we reported the highest concentrations of Fe and Al, exceeding the legal standards all along the DRB, with the highest concentrations of Al in the Lower DRB. However, the other elements presented mostly undetectable levels. According to IGAM (2020), in the last years, regions closer to the Fundão dam, such as the Gualaxo do Norte, Carmo and Casca rivers have permanently exhibited high concentrations of As. The same report indicated that, three years after the dam failure, the concentrations of Cd in water samples from the Gualaxo do Norte, Carmo and for most samples from Rio Doce still were exceeding the federal standards.

In the fifth sampling, carried out in the dry season of 2019, the metals concentrations were lower than those reported in the previous sampling survey, confirming the trend of decreasing concentrations of metals in waters corroborating with Richard et al (2020), who observed high levels of Fe-total in the water collected shortly after the disaster, and As, Cd, Cu, Pb and Zn in excess when compared to the legislation. This oscillation in the metals levels, still within the mentioned trend, may be related to the natural dynamics of the river, where the values of some elements tend to be lower in dry seasons and higher in flood periods due to resuspension and remobilization processes (Vergilio et al, 2021). Some of such oscillations indicate a tendency of lower concentration of metals in waters during the dry seasons and higher metal levels during the rainy periods, suggesting that physical processes (i.e. turbulent flow; leaching and sediment drag from the river banks and drainage basin) favor the remobilization of elements to the water column and their transport downstream and towards the sea (Richard et al., 2020; Vergilio et al., 2021). Our results corroborate the findings of Mendes et al. (2022), who modelled the process leading to the transport of tailings (and metals) downstream.

According to the literature, the mining waste from the Fundão dam caused changes in the sandy natural physical composition of the sediments that were covered by the Fe ore slurry (Gomes et al., 2017; Duarte et al., 2021). The rapid deposition of metals-rich tailings, in combination with hydrological processes, especially the regime of floods and droughts, led the metal concentrations to exceed the acceptable levels for the resident biota. In fact, Costa et al. (2022) showed that the aquatic biota from the Doce River and nearby coastal areas were exposed to metals and As and exhibited bioaccumulation of several elements.

Moreover, the disaster also involved the spill of millions of tons of mud into a predominantly sandy environment (Duarte et al., 2021). Finer sediment particles are more capable to adsorb contaminants, thus, as the particle size is reduced, the possibilities of increased concentrations of metals are higher, so are the chances of increased toxicity (Almeida, 2018). In the first sampling survey, the sediments were mainly muddy, indicating the presence of mining tailings along the entire course of the river. Gomes et al. (2017) also observed a considerable predominance of finer grains in the sediments from DRB after the Fundão dam rupture. The sediments collected in the third sampling survey, one year after the breach, were predominantly sandy, but sediments from some sites remained muddy. The presence of muddy sediments may be caused by the presence of tailings or may indicate the contribution of tributaries

to the Rio Doce. For example, Casca and Matipó rivers, which flow towards the J5 vicinities, can interfere on the presence of fine sediments, due to the erosion process (Coelho, 2009). In the 4th and 5th sampling surveys, the sediments were mostly sandy and similar to each other, suggesting that the muddy fraction associated with the tailings may have been leached and carried downstream, possibly even reaching the sea, as supported by the model proposed by Mendes et al. (2022) for the Paraopeba river.

On the other hand, the levels of organic matter showed a strong tendency to remain stable over time. Some variability was observed in the first and third sampling surveys, but from 2019, the OM quantities tended to remain homogeneous along space and time. Our data corroborate with Bernardino et al. (2019), who observed homogeneity of organic matter quantities in estuarine sediments influenced by the tailings 1.5 years after the dam rupture. According to the literature, organic matter can sorb metallic elements reducing the metals solubility and reactivity (Arantes et al., 2009; Gomes et al., 2017).

A reduction in metal concentrations over time in the sediments was observed, together with the reduction in metal enrichment between the 2015 and 2019, through the EF calculation. This phenomenon can be explained by two factors: a) clearance and recovery from post-disaster conditions; and b) seasonality (Richard et al, 2020; Nogueira et al., 2021). A similar situation was observed in the Maramureş County, northwest Romania, where a tailing dam failure resulted in the release of 200,000 m³ of contaminated water and 40,000 tonnes of tailings into tributaries of the Tisa River, a tributary of the Danube River. In that case a rapid reduction of metals concentrations in water and sediment was observed (Macklin et al., 2003).

Despite the spillage of mining tailings from the Fundão dam contributing to an immediate increase of metals in sediments, shortly after the dam rupture, regions of the Middle and Lower DRB do not suffer impacts related solely to this episode in a specific way, as a single event, but a contamination of activity from inexhaustible polluting sources, such as industries in the Steel Valley, domestic sewage, agriculture, and other interferences that accelerate environmental degradation (Viqc et a., 2015). In addition to the occurrence of As in the content of the tailings released in the dam breach (Duarte et al., 2021), the occurrence of As at high levels in sediments collected in the Upper DRB may be related to mining activities, in special gold (Au) extraction, which dates three centuries back before the Mariana disaster (Parra et al., 2007; Dávila et al., 2020; Cagnin et al., 2017) added to an increase in concentrations due to the remobilization of historically contaminated sediments (Duarte et al., 2021). Sediments from the Upper DRB are formed from Fe-rich rocks, dominated by quartzite and itabirite (rock rich in hematite), in addition to Mg and Au. Thus, in the Upper DRB (sites M2, J2, J3 and J4) the high concentrations of Fe, Mn and Al in water and sediments could be expected (Segura et al., 2016; Richard et al., 2020), since these elements can be remobilized, in addition to the anthropogenic inputs due to mining activities (Hatje et al., 2017).

The Igeo calculation showed little or no contamination by metals in most locations in all campaigns, except for some sampling sites from the Upper DRB and the higher values observed in the last campaign may be related to a reduced diluting capacity. Our study corroborates data from Guerra et al. (2017) who observed that As and Mn levels exceeded legal values in sediments collected days after the rupture, in regions close to Candonga, despite not representing discrepancies when compared with background values. The same study suggested that downstream environments could be highly impacted by the increases of the concentrations of As and Mn.

The toxicity of water samples showed lack of adverse effects in the first sampling survey (i.e., immediately after the dam failure), but after six months after the water samples were mostly toxic. In the following surveys, the toxicities tended to reduce, and few samples were considered toxic; moreover, the effects were generally not related with the metals. Our results differed from those observed by Vergilio et al. (2021), who reported significant toxicity of water samples collected 15 days after the disaster. Mendes et al. (2020) observed a decrease in toxicity when comparing the results of exposure to *D. similis* in water samples collected between 2015 and 2017, which is in agreement with our results, and that toxicity was higher in the presence of suspended particles. Moreover, in the surveys conducted in 2019, samples not influenced by the tailings were toxic (i.e. REF), suggesting that other factors may be responsible to the observed effects. The input of unknown diffuse industrial pollutants into the DRB can be responsible for part of the negative effects on biota (Yamamoto et al., 2022b); however, these authors observed negative effects in fish embryos of *Rhamdia quelen* exposed to elutriates prepared from sediments of DRB, and metal-rich sediments collected at the Upper DRB affected the embryos development and survival.

Some studies carried out in areas affected by mining, such as regions of the Ribeira de Iguape river, demonstrated that areas affected by mining activities may not show toxicity to *D. similis*, even when the concentrations of metals exceed the legal standards (Abessa et al., 2012; Moraes et al., 2013). According to such authors, this may be caused by factors influencing the metals bioavailability, and the characteristics of the exposed organisms, and the presence of binders such as organic matter. However, since Costa et al. (2022) reported bioaccumulation of metals and As a range of taxonomic groups from the DRB, it can be inferred that part of the elements are bioavailable. The absence of toxicity to daphnids in our study may suggest that, at short-term, the organisms may be capable to handle the absorbed elements and avoid acute toxicity. However, studies considering chronic effects and long term exposure are necessary.

Unlike the results obtained for water samples, the toxicity of sediments was higher in the first sampling survey. In the following surveys, the sediment toxicity tended to reduce. These results can be explained due to the environmental conditions, where metallic elements released by oxidation in the mineral enrichment process are adsorbed onto Fe oxyhydroxides or other clay minerals in large quantities in the ecosystem (Hatje et al., 2017). Furthermore, the most frequent element in the chemical analyzes of sediments was Fe, which is very common in the earth's crust and a fundamental element for the functioning and growth of organisms (Fontecave & Pierre, 1993) and therefore represents little toxicity. However, the toxicities did not correlate with the metals, suggesting that other factors could be causing the effects observed. Yamamoto et al. (2022) observed that the highest levels of biochemical changes among the organisms tested were among those exposed to elutriates with the highest concentration of PAHs, yet metals-rich elutriates had also affected the exposed fish. Our study found high levels of metals in regions not affected by the tailings and that may be related to industrial activities established decades ago in the DRB, in addition to the disposal of urban sewage and agriculture (IBAMA, 2015; Hatje et al., 2017). Thus, the current scenario in the DRB evidences the combined influence of multiple contamination sources, including not only the tailings released by the Fundão dam rupture, but also the historical contamination caused by the mining activities, the discharge of sewage and industrial effluents, and agricultural leachates rich in fertilizers, metals and pesticides (Yamamoto et al., 2023). In this sense, actions to restore and manage the DRB need to address all the sources, in order to achieve appropriate goals of environmental quality.

Conclusion

The release of tons of metals-rich ore tailings into the DRB after the Fundão dam rupture caused an immediate increase of the concentrations of metals in waters and sediments of whole river course. However, the concentrations in both waters and sediments clearly exhibited a decreasing trend over time, as well as the amounts of muddy fractions in sediments, indicating the recovery processes along the river and a transport of the tailings (and metals associated) towards the sea, where the implications need to be further studied. Four years after the dam failure, the concentrations of most metals are similar to those observed prior to the disaster. However, such levels are still high for some elements and require further studies to indicate if they can cause chronic impacts to the biota. On the other hand, the acute toxicity observed in water and sediments was more evident immediately after the dam rupture; in a longer term the acute toxicity to daphnids occurred more sporadically and without presenting correlations with the metal contents. Thus, our results suggest the metais are not bioavailable to *Daphnia* spp in quantities enough to cause short-term adverse effects to such organisms. However, chronic studies considering long-term exposures are necessary to determine the potential effects to the native organisms.

Acknowledgements:

We thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support (Research grants #2018/23279-4 and #2016/15229-1). FCP thanks CAPES-FAPEMIG-FAPES-CNPq-ANA for the fellowship (Process #23038.028816/2016-41), and DMSA thanks CNPq for the PQ fellowship.

Statements and Declarations

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

Author Contribution statement

GFEP led the study and contributed to the study design and conceptualization, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing. FCP contributed to the conceptualization, data acquisition and analysis, and manuscript editing. FYY contributed to field sampling, laboratorial testing, data acquisition and interpretation, and manuscript revisions. THT and BSMK contributed to the data acquisition and analysis, and manuscript editing. ACFC contributed to the methodology and analysis, and laboratorial testing. CCR contributed to the methodology and laboratorial testing. HCA contributed to the laboratorial testing. LM and DP and FB contributed to field sampling assisted in the study design. RCLF contributed to study conceptualization, data acquisition and analysis, and manuscript editing. DA contributed to the concept design, laboratorial experiments, data analysis and interpretation, resources, and manuscript writing.

References

Abessa, D. M. S. (2016). *Avaliação de risco ecológico no Rio Ribeira de Iguape (SP , Brasil) devido à contaminação por antigas atividades de mineração*. Tese de Livre-Docência ((Ciências Biológicas

– Saneamento Ambiental e Ecotoxicologia Aquática) – Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista.

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2016). NBR 12713. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) Aquatic. *Associação Brasileira de Normas Técnicas, 4ª Edição*, 1–23. Retrieved from <http://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/7483>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.071>
- ANA - Agência Nacional de Águas. (2001) Bacias Hidrográficas do Atlântico Sul – Trecho Leste: sinopse de informações do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Sergipe. Brasília: ANA, 2001. (Série: Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos – Documentos)
- Arantes, I. A., Pinto, M. T. C., Mangabeira, P. A., Grenier-Loustalot, M. F., Veado, M. A. R. V., & Oliveira, A. H. (2009). Mercury concentration in fish from Piracicaba River (Minas Gerais, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, 156(1–4), 119–130. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0468-2>
- Azam, S., & Li, Q. (2010). Tailings dam failures: A review of the last one hundred years. *Geotechnical News*, 28(4), 50–53.
- Barros, L. F. P., Junior, A. P. M. (2019). O papel da Bacia do Rio Doce na configuração geomorfológica do Quadrilátero Ferrífero. *Bol. geogra.* 37(1), 145-167.
- Bilos, C., Colombo, J. C., & Rodriguez Presa, M. J. (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and asiatic clams (*corbicula fluminea*) of the Río de La Plata estuary, Argentina. *Environ. Pollut.*, 99, 1–11.
- Borba, R.B., 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
- Brasil, República Federativa (2005). Resolução CONAMA nº 357, 18 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, (053), 58–63. www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf (accessed on March 28, 2020)
- Brasil (2015). Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Minas Gerais (2015)
- Brasil (2016). Sumário Mineral - Departamento Nacional de Produção Mineral (2016). 135p.
- Buratini, S. V., Bertolotti, E., & Zagatto, P. A. (2004). Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(5), 878–882. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0508-8>
- Buruaem, L. M., de Castro, Í. B., Hortellani, M. A., Taniguchi, S., Fillmann, G., Sasaki, S. T., ... Abessa, D. M. D. S. (2013). Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.06.006>
- Coelho, A. (2009). Bacia hidrográfica do Rio Doce(MG/ES):uma análise socioambiental integrada. *Revista Geografica*, 7, 131-146.
- Corsi, I., Mariottini, M., Badesso, A., Caruso, T., Borghesi, N., Bonacci, S., ... Focardi, S. (2005). Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European

- eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Hydrobiologia*, 550(1), 237–249. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-4392-y>
- Costa, A. T., Nalini Jr, H. A. N., Lena, J. C., Friese, K. & Mages, M. (2003). Surface Water Quality and Sediment Geochemistry in the Gualaxo Do Norte Basin, Eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil.” *Environmental Geology*, 45 (2), 226–35. doi:10.1007/s00254-003-0870-6.
- Costa, A. T., Nalini Jr, H. A., Castro, P. T. A., Lena, J. C., 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 Hydrochimica et Hydrobiologica*, 34(3), 245–256. <https://doi.org/10.1002/ahch.200400625>
- Costa, A. T., Nalini, H. A., de Tarso Amorim Castro, P., & Tatumi, S. H. (2010). Stratigraphic analysis and distribution of arsenic in quaternary sedimentary deposits of the southeastern portion of the Quadrilátero Ferrífero, basin of the Ribeirão Carmo, MG. *Revista Escola de Minas*, 63(4), 703–714. <https://doi.org/10.1590/s0370-44672010000400017>
- Costa, P. G., Marube, L. C., Artifon, V., Escarrone, A. L., Hernandez, J. C., Zebal, Y. D., Bianchini, A. 2022. Temporal and spatial variations in metals and arsenic contamination in water, sediment and biota of freshwater, marine and coastal environments after the Fundão dam failure. *Science of the Total Environment*, 806 (151340), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151340>
- 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. *Science of the Total Environment*, 709, 136151. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136151>
- Deschamps, E., Ciminelli, V. S. T., Lange, F. T., Matschullat, J., Raue, B., & Schmidt, H. (2004). Soil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil. *Journal of Soils and Sediments*, 4(3), 169–169. <https://doi.org/10.1007/BF02991135>
- Duarte, E. B., Neves, M. A., de Oliveira, F. B., Martins, M. E., de Oliveira, C. H. R., Burak, D. L., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88–95.
- Escobar, H. (2015). Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. *Science*, 350(6265), 1138–1139. <https://doi.org/10.1126/science.350.6265.1138>
- Ferreira, A. L. G., Serra, P., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2010). The influence of natural stressors on the toxicity of nickel to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(6), 1217–1229. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0298-y>
- Ferreira, F. F., de Freitas, M. B. D., Szinwelski, N., Vicente, N., Medeiros, L. C. C., Schaefer, C. E. G. R., ... 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. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 622–630. <https://doi.org/10.1002/ieam.4289>
- Fisk, A. T., Hobson, K. A., & Norstrom, R. J. (2001). Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environmental Science and Technology*, 35(4), 732–738. <https://doi.org/10.1021/es001459w>
- Fontecave, M., & Pierre, J. L. (1993). Iron: Metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie*, 75(9), 767–773. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90126-D](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90126-D)
- Fundação RENOVA. (2019). Relatório Trimestral Simplificado - Programa de Monitoramento Quali-Quantitativo Sistemático de Água e Sedimentos – PMQQS, (31), 36420.
- Gabriel, F. Â., Hauser-davis, R. A., Oliveira, L., Soares, S., Mazzuco, C. D. A., Christian, R., ... Ferreira,

- T. O. (2020). Metal contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *BioRxiv*, 2020.06.29.177253. <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.177253>
- Gabriel, F. A., Silva, A. G., Queiroz, H. M., Ferreira, T. O., Hauser-Davis, R. A., & Bernardino, A. F. (2020). Ecological Risks of Metal and Metalloid Contamination in the Rio Doce Estuary. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 655–660. <https://doi.org/10.1002/ieam.4250>
- Gagné, F., & Blaise, C. (1993). Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Research*, 27(11), 1669–1682. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90131-Z](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90131-Z)
- Galuszka, A. (2007). Different approaches in using and understanding the term — Geochemical Background — practical implications for environmental studies. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3)389-395
- GIAIA. (2016). Relatório-Técnico Determinação De Metais Na Bacia Do Rio Doce (Período: Dezembro-2015 a Abril-2016), 1–71.
- Gomes, L. E. de O., Correa, L. B., Sá, F., Neto, R. R., & Bernardino, A. F. (2017). The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1–2), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.056>
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>
- IGAM. (2020). Encarte Especial Sobre a Qualidade Das Águas Do Rio Doce Após 4 Anos Do Rompimento De Barragem De Fundão -2015/2019 http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/2020/QUALIDADE_AGUAS/Encarte_4_anos_-_Desastre_Doce_-_Final.pdf, 77. Retrieved from <http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/sala-de-situacao/rio-doce/documentos-relacionados/encarte-qualidade-da-gua-do-rio-doce-dois-anos-apos-rompimento-de-barragem-de-fundao-1.pdf>
- IBAMA. (2015). Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Laudo Técnico Preliminar, 1, 2–35. Retrieved from http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/laudo_tecnico_preliminar.pdf
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183–6188.
- Kim, H.J., Koedrith, P., & Seo, Y.R. (2015). Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 12261-12287. <https://doi.org/10.3390/ijms160612261>
- Lacerda, F. M., & Roeser, H. M. P. (2014). Análise geoquímica e ambiental para descrição da Bacia do Rio Oratórios (MG). *Geochimica Brasiliensis*, 28(2), 227–236. <https://doi.org/10.5327/Z0102-9800201400020010>
- Liccardo, A., Sobanski, A., & Chodur, N. L. (2004). O Paraná na história da mineração no Brasil do século XVII. *Boletim Paranaense de Geociências*, (54), 41–49.
- Lima e Silva, C., Costa, A. T., Landa, G. G., Fonseca, H. F. C., & Silveira, A. (2013). Evaluation of sediment contamination by trace elements and the zooplankton community analysis in area affected by gold exploration in Southeast (SE) of the Iron Quadrangle , Alto Rio Doce , (MG) Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensis*, 25(2), 150–157. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S2179-975X2013000200006>
- Lins, F. A. F., Loureiro, F. E. V. L., Albuquerque, G. A. A. S. C. (2000). Brasil 500 anos - A construção do Brasil e da América Latina: histórico, atualidade e perspectiva. centro de Tecnologia Mineral,

RJ, 254p.

- Long, E. R., & Chapman, P. M. (1985). A Sediment Quality Triad: Measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, 16(10), 405–415. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(85\)90290-5](https://doi.org/10.1016/0025-326X(85)90290-5)
- Luczak, C., Janquin, M. A., & Kupka, A. (1997). Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, 345(1), 87–94. <https://doi.org/10.1023/A:1002902626798>
- Macêdo, A. K. S., Santos, K. P. E. dos, Brighenti, L. S., Windmöller, C. C., Barbosa, F. A. R., Ribeiro, R. I. M. de A., ... Thomé, R. G. (2020). Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Science of the Total Environment*, 735. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>
- Macklin, M. G., Brewer, P. A., Balteanu, D., Coulthard, T. J., Driga, B., Howard, A. J., Zaharia, S. (2003). The long term fate and environmental significance of contaminant metals released by the January and March 2000 mining tailings dam failures in Maramureş County, upper Tisa Basin, Romania. *Applied Geochemistry*, 18(2), 241–257. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00123-3)
- Marta-Almeida, M., Mendes, R., Amorim, F. N., Cirano, M., & Dias, J. M. (2016). Fundão Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. *Marine Pollution Bulletin*, 112(1–2), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.039>
- Mendes, L. B., Mello, F. A., Chagas, K. R., Campelo, R. P. M., Medeiros, L. C. C., Smith, R. E. W., & Furley, T. H. (2020). Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the Fundão Dam Collapse. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 0–2. <https://doi.org/10.1002/ieam.4291>
- Mender, R. G., Valle Júnior, R. F., Silva, M. M. A. P. M., Fernandes, G. H. M., Fernandes, L. F. S., Fernandes, A. C. P., Pissarra, T. C. T., Melo, M. C., Valera, C. A., Pacheco, F. A. L. (2022). A partial least squares-path model of environmental degradation in the Paraopeba River, for rainy seasons after the rupture of B1 tailings dam, Brumadinho, Brazil. *Science of The Total Environment*, 851 (158248), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158248>
- Molenaar, P. C. M., Wang, Z., & Newell, K. M. (2013). Compressing movement information via principal components analysis (PCA): Contrasting outcomes from the time and frequency domains. *Human Movement Science*, 32(6), 1495–1511. <https://doi.org/10.1016/j.humov.2013.07.017>
- Morais, L. G., Perina, F. C., Davanso, M. B., Buruaem, L. M., Rodrigues, V. G. S., Sígolo, J. B., & Abessa, D. M. S. (2013). Water and sediment ecotoxicological assessment in a river affected by former mining activities. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 8(4), 327–338.
- Moreira, L. B., Fernandes, G. M., Figueira, R. C. L., nascimento, R. F., Cavalcante, R. M., Machado, W. T. V. & Abessa, D. M. S. (2021). Sediment contamination and toxicity of Marine Protected Areas in southeastern Brazilian coast: A baseline for management planning. *Marine Pollution Bulletin*, 170, 112613.
- Mount, D. A. R. M., Gulley, D. A. D. G., Hockett, J. R. U. H., Garrison, T. Y. D. G., & Evans, J. A. M. E. (2009). STATISTICAL MODELS TO PREDICT THE TOXICITY OF MAJOR IONS TO CERIODAPHNIA DUBIA, DAPHNIA MAGNA AND PIMEPHALES PROMELAS (FATHEAD MINNOWS). *Environmental Toxicology*, 16(10), 2009–2019.
- Muller, G. (1979). Schadstoffe in Sedimenten - Sedimente als Schadstoffe. *Umsch. Wissensch. Techn.* 79(24), 778–783.
- Nogueira, L. B., Sousa, S. M., Santos, C. G. L., Araújo, G. S., Oliveira, L., & Nogueira, K. O. P. C. (2021). Water quality from gualaxo do Norte and Carmo Rivers (Minas Gerais, Brazil) after the fundão dam failure. *Anuario Do Instituto de Geociencias*, 44, 1–11. <https://doi.org/10.11137/1982->

- Nys, C., Asselman, J., Hochmuth, J. D., Janssen, C. R., Blust, R., Smolders, E., & De Schamphelaere, K. A. C. (2015). Mixture toxicity of nickel and zinc to *Daphnia magna* is noninteractive at low effect sizes but becomes synergistic at high effect sizes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1091–1102. <https://doi.org/10.1002/etc.2902>
- OECD - Guidelines for the testing of chemicals (2013). Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- Oliveira JJC, Ribeiro JH, Souza Oki S, Barros JRR (1979) Projeto geoquímica do Quadrilátero Ferrífero: levantamento orientativo e regional. Relatório final, vol I. CPRM, Belo Horizonte
- Passos, L. S., Gnocchi, K. G., Pereira, T. M., Coppo, G. C., Cabral, D. S., & Gomes, L. C. (2020). Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? *Science of the Total Environment*, 736, 139644. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>
- Pires, J. M. M., Lena, J. C. de, Machado, C. C., & Pereira, R. S. (2003). Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco Mineração: estudo de caso da barragem de Germano. *Revista Árvore*, 27(3), 393–397. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622003000300017>
- Queiroz, H. M., Ying, S. C., Abernathy, M., Barcellos, D., Gabriel, F. A., Otero, X. L., ... Ferreira, T. O. (2021). Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. *Environment International*, 146(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106284>
- Reeder, R. J., Schoonen, M. A. A., & Lanzirotti, A. (2006). Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64, 59–113. <https://doi.org/10.2138/rmg.2006.64.3>
- Rhodes, V. (2010). Distribuição de mercúrio e arsênio nos sedimentos da área afetada por garimpo de ouro–Rio Gualaxo do Norte, Mariana, MG, 93. Retrieved from <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/2274>
- Ribeiro, F., Ferreira, N. C. G., Ferreira, A., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2011). Is ultraviolet radiation a synergistic stressor in combined exposures? The case study of *Daphnia magna* exposure to UV and carbendazim. *Aquatic Toxicology*, 102(1–2), 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.007>
- Richard, E.C., de Aguiar Duarte, H., Calderucio Duque Estrada, G., Bechtold, J. P., Gusso Maioli, B., Araujo de Freitas, A. H., ... Melges Figueiredo, L. H. (2020). Influence of Fundão Tailings Dam Breach on Water Quality in the Doce River Watershed. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 583–595. <https://doi.org/10.1002/ieam.4311>
- Rico, M., Benito, G., Salgueiro, A. R., Díez-Herrero, A., & Pereira, H. G. (2008). Reported tailings dam failures. A review of the European incidents in the worldwide context. *Journal of Hazardous Materials*, 152(2), 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.050>
- Rodgher, S., Espíndola, E.L.G., & Lombardi, A.T. (2010). Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. *Ecotoxicology* 19, 1027–1033. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0484-1>
- 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. *Environmental Earth Sciences*, 68(4), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-1799-4>
- Schettini, C. & Hatje, V. (2020). The Suspended Sediment and Metals Load from the Mariana's Tailing Dam Failure to the Coastal Sea. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 661–668.
- Sedlak, J., Lindsay, R. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in

- tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25:192–205.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú. L., Pedreira Filhp, W.R., Barbosa Jr, 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(August 2016), 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>
- Silva, J. V., Andrade, M. J. G. (2016) In: Milanez, B., Lozekann, C., DESASTRE NO VALE DO RIO DOCE, Antecedentes, impactos e ações sobre a destruição, Letra e Imagem, RJ, 438p.
- Souza, A. P. R., Braga, E. S., Bertotti, M. (2012). On Site Stripping Voltammetric Determination of Zn(II), Cd(II) and Pb(II) in Water Samples of the Cananéia-Iguape Estuarine-Lagoon Complex in São Paulo State, Brazil, 23(7), 1320–1326.
- Struewing, K. A., Lazorchak, J. M., Weaver, P. C., Johnson, B. R., Funk, D. H., & Buchwalter, D. B. (2015). Part 2: Sensitivity comparisons of the mayfly *Centroptilum triangulifer* to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* using standard reference toxicants; NaCl, KCl and CuSO₄. *Chemosphere*, 139(December), 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.096>
- Trevizani, T. H., Figueira, R. C. L., Ribeiro, A. P., Theophilo, C. Y. S., Majer, A. P., Petti, M. A. V., ... Montone, R. C. (2016). Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1–2), 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.056>
- USEPA. (1996). Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. *The Journal of the Japan Society for Bronchology*, 18(7), 723. https://doi.org/10.18907/jjsre.18.7_723_2
- USEPA. (2000). Method 6010C (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry,. *Encyclopedia of Volcanoes.*, 26(2), 662. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-2012.2019.02.001>
- USEPA. (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms: Fifth Edition. *Epa/821/R02/012*, (October), 266. Retrieved from <http://www.epa.gov/waterscience/WET/disk1/ctm.pdf>
- USEPA. (2014). Method 6020B (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, (July), 165.
- Van Der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., & Vermeulen, N. P. E. (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: Pollution-induced responses. *Aquatic Toxicology*, 36(3–4), 189–222. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00802-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00802-8)
- 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). NAA: 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*.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N., & Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 37–42. [https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90168-9](https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/0742-8413(90)90168-9)

- Vieira, C. E. D., Marques, J. A., da Silva, N. G., Bevitório, L. Z., Zebral, Y. D., Maraschi, A. C., ... Sandrini, J. Z. (2022). Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. *Science of the Total Environment*, 832(March). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>
- Vieira, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MGBiota*, 2(5), 5–22. Retrieved from http://ief.mg.gov.br/images/stories/MGBIOTA/mgbiota11/mgbiot_v.2n.5.pdf#page=5
- 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(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Wentworth, C. C. K. (1922). A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, 30(5), 377–392. <https://doi.org/10.2307/30063207>
- Wills, E. D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes, in: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. Washington, DC (USA): IRL Press, pp. 127–150.
- Yamamoto, F Y, Pauly, G. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Kim, B. S. M., ... 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.E.F.; 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*, <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100250>
- Yamamoto, F. Y., Thaisa, A., Souza, C., Paula, V., S. De, Beverari, I., Garcia, J., Padial, A., Abessa, D. S. (2022b). From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Science of the Total Environment*, 846(March), 157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>
- Zuykov, M., Pelletier, E., & Harper, D. A. T. (2013). Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*, 93(2), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001>

Capítulo 2 – Análise de bioacumulação de metais em *C. fluminea* expostos em sedimentos influenciados por rejeitos de mineração por ICP-OE.

SPATIAL-TEMPORAL VARIATIONS OF METALS AND AS IN SEDIMENTS FROM DOCE RIVER AFTER THE FUNDÃO DAM RUPTURE AND THEIR BIOACCUMULATION IN CORBICULA FLUMINEA²

Guacira de Figueiredo Eufrazio Pauly^{a,*}; Ana Carolina Feitosa Cruz^a; Tailisi Hoppe Trevizani^b; Bianca Sung Mi Kim^b; Fernando Cesar Perina,^{a,c}; Flávia Yoshie Yamamoto^a; Rubens Cesar Lopes Figueira^b; Denis Moledo de Souza Abessa^a

^a São Paulo State University – UNESP. Praça Infante Dom Henrique, s/n. 11330-900. São Vicente, SP, Brazil.

^b University of São Paulo – USP, Oceanographic Institute, LacMar. Praça do Oceanográfico, 191. 05508-129. São Paulo, SP, Brazil.

^c Universidade de Aveiro, Centro de Estudos do Ambiente e do Mar - CESAM. 3810-193. Aveiro, Portugal.

* Corresponding author: guafe@yahoo.com.br

Abstract

The rupture of the Fundão dam, in Brazil, released tons of mining tailings into the Doce River basin (DRB). This investigation aimed to determine the bioaccumulation of metals in soft tissues of the bivalve *Corbicula fluminea* exposed to sediments collected in the DRB in four periods (just after, 1, 3, and 3.5 years after the dam rupture). In the exposure bioassays, the concentrations of Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn in sediments and bivalve soft tissues were quantified. The concentration of some elements (As, Cd, Mn, Al) in sediments exceeded the federal limits or regional backgrounds at some sampling sites, but their levels tended to decrease along time. However, higher

² Artigo publicado no jornal Integrated Environmental Assessment and Management (IEAM) – Special Issue from the SETAC-LA Rio Doce (2023). <https://doi.org/10.1002/ieam.4773>

concentrations of many elements were detected in the winter 2019. Several elements were detected in *C. fluminea* soft tissues, but the bioaccumulation factors (BAFs) were generally low or not related with those elements associated with the ore tailings, evidencing that the bioavailability of metals to bivalves, in laboratorial conditions, was limited.

Key words: aquatic contamination, metals, bivalves, mining residues, sediments.

INTRODUCTION

The rupture of the Fundão Dam, in Mariana (MG, Brazil) on November 5, 2015, released more than 40 million m³ of mining tailing into the Doce River basin (DRB). This material flowed downstream through more than 600 Km of river course till reaching the Atlantic Ocean (Escobar, 2015). Immediately after the dam rupture, the iron ore tailings wave contributed to an increase in the concentrations of metals such as aluminum (Al), arsenic (As), cadmium (Cd), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), lead (Pb), nickel (Ni), and zinc (Zn) across the impacted environment (Hatje et al., 2017; IGAM, 2015), together with changes in sediments grain size, especially the elevation of mud (silt and clay) percentages (Duarte et al., 2021; Gabriel et al., 2021). The immediate effects included alterations of benthic communities, as many species were rapidly eliminated or reduced populations' density, and the surviving organisms were permanently exposed to high concentrations of metals (Duarte et al., 2021). As a result, the organisms from DRB exhibited tissue, physiological and cellular damages (Bernardino et al. 2019; Passos et al. 2020; Gabriel et al. 2021; Vieira et al. 2022).

After the dam rupture, a huge mud-wave spread the tailings across the Carmo, Gualaxo do Norte and Doce rivers. Additionally, part of the tailings deposited on the riverbed and river banks and started to be transported downstream by the river flow

(Gabriel et al., 2021), especially during the rainy season, when the bedload carriage and the amount suspended solids in the water column are augmented (Andrades et al., 2022). Despite the temporal trend of reduction of metals concentrations in the water and sediments of DRB, Gabriel et al. (2021) estimated the local ecological risks associated with metals and suggested that they could last because the environmental concentrations were still exceeding the toxic thresholds.

The ecological hazards and risks associated with the presence of metals in the environment depend not only on their respective concentrations, but also on their bioavailability (Di Toro et al., 2001) and the elements' interaction with biotic ligands. Exchangeable cationic metals may bind to a set of ligands, such particulate and dissolved organic matter, oxyhydroxides, carbonates, and silicates, and then become less or not bioavailable (Burton et al., 2019; Huntsman et al., 2019). In this sense, more specific studies would be required to quantify metals bioavailability and toxicity in the DRB, including laboratorial analyses conducted under controlled conditions.

Sediments constitute a sink for most of contaminants and a source of contaminants to benthic organisms and the adjacent water column (Chapman and Wang, 2001). Contaminants adsorbed on the sediments may become bioavailable and be released to the water column or the biota, resulting in uptake and accumulation in the soft tissues of the aquatic organisms (Chapman, 1989) and consequently affecting their health, with negative ecological implications (Ferreira et al. 2020; Gabriel et al. 2020). Thus, assessing the bioavailability and toxicity of metals associated with the tailings released after the Fundão dam rupture is still a critical need. Moreover, synoptic data of sediment chemistry and bioaccumulation may be important to the development of chemometric approaches aimed to predict sediment toxicity, as those proposed by Alvarez-Guerra et al. (2010a,b).

Burrowing benthic species, such as the bivalve *Corbicula fluminea*, are permanently in contact with sediments and may be used to assess or monitor this environmental compartment (Zuykov et al., 2013). *C. fluminea* is an invasive species widely spread worldwide that was already found in the DRB (Vidigal et al., 2005) and other water bodies from Brazil (Bonnail et al., 2016). This species was proposed to be a suitable sentinel to evaluate environmental contamination (Pereto et al, 2020) and has been used to monitor the metal contamination caused by mining residues in Brazilian rivers (Guimarães and Sígolo, 2008; Bonnail et al., 2017; 2018). Thus, *C. fluminea* could be a potential biomonitor for studying the bioavailability of metals in sediments of the DRB, through standardized exposure bioassays. The analysis of bioaccumulation of metals in its soft tissues could provide additional information to the comprehension of the bioavailability of metals and consequently potential risks to the environment and human health (through direct consumption). In this investigation, we assessed the concentrations of metals in sediments collected after the dam rupture (between 2015 and 2019) and in the soft tissues of *C. fluminea* exposed to these sediments in laboratory bioassays. Thus, this investigation aimed to evaluate, under controlled conditions, the bioavailability of metals to a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*), with the purpose of adding a new piece into the puzzle represented by the assessment of the environmental impacts caused by the Fundão dam rupture.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

The DRB includes a drainage area of about 86,715 km², involving parts of the states of Minas Gerais (MG) and Espírito Santo (ES), in the Southeast Brazil. Approximately 85% of DRB is in MG (ANA, 2015). The Doce River has more than 850

km long and is the main watercourse of the basin; it can be divided into three main regions (Upper, Medium, and Lower). The upper DRB is characterized by mining activities, agriculture, urban occupation, and the presence of dams for electric energy generation or deposition of mining residues (IGAM, 2017). The medium portion of DRB presents industrial activities (steel plants, food and beverage, and others), intense urban occupation, and hydroelectric power stations. The lower DRB starts at the Mascarenhas electric power station (at Baixo Guandu) and extends towards the river mouth, situated in Regência, North coast of ES (IGAM, 2017; Vieira, 2009). This part of the river basin presents mainly agricultural activities.

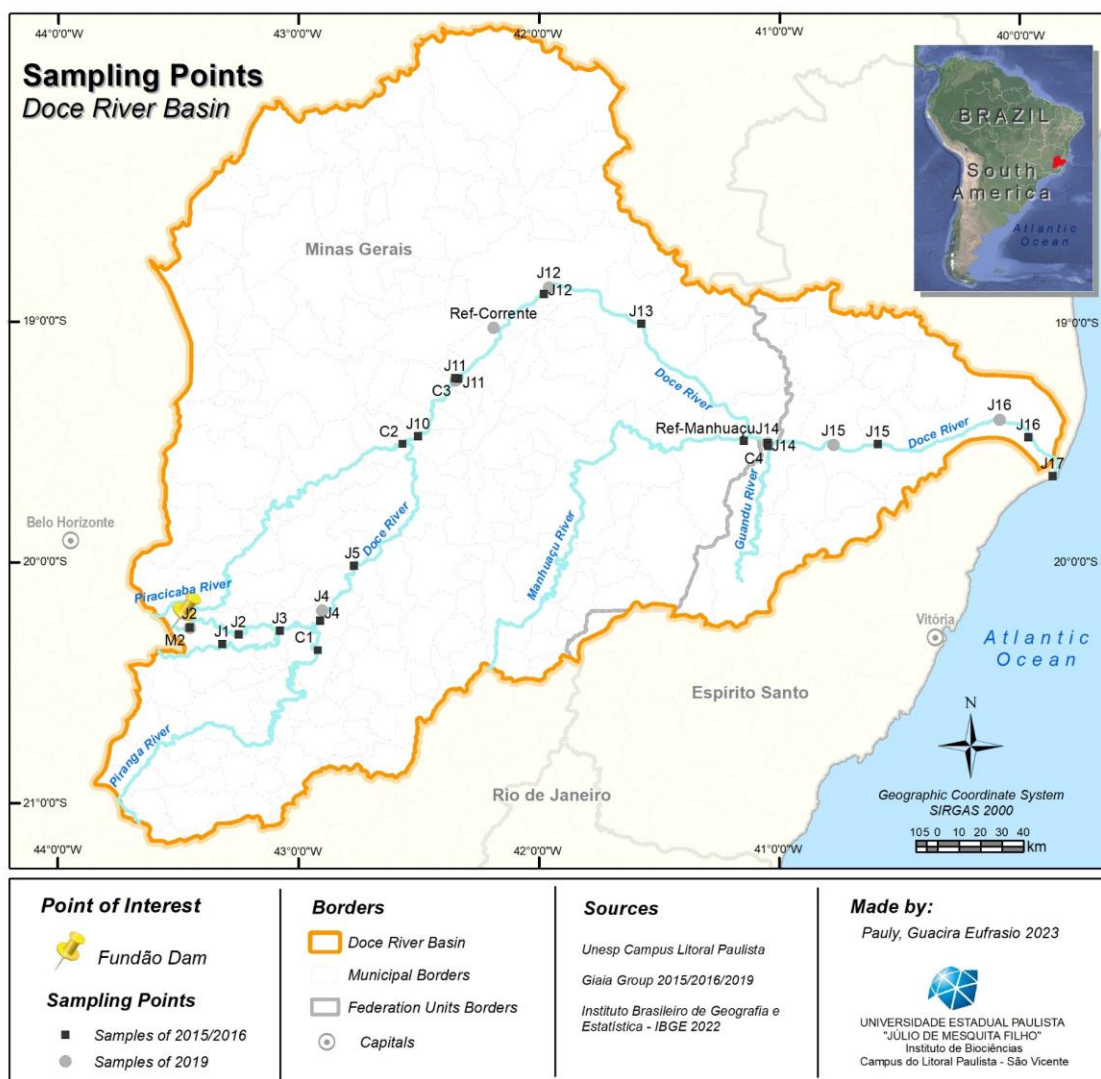


Figure 1 – Overview of the Doce River Basin (DRB), showing the location of the sampling sites. Black squares indicate sediments the sites sampled in 2015 and 2016, while gray circles indicate sediments sampled in 2019.

Sediment sampling

Four sediment sampling surveys were performed, between 2015 and 2019, and included sampling sites located since the proximities of the Fundão dam and reaching up the estuarine region. The first sampling survey was done between November and December 2015, immediately after the dam rupture, while the second one occurred between November and December 2016, one year after the rupture. The 3rd and 4th sampling surveys were done in January-February 2019, and July-August 2019 respectively, and involved the rainy and dry seasons. The sampling sites were determined considering the areas affected by the disaster, the presence of other contamination sources, and the evolution of knowledge regarding its environmental impacts. Thus, the number and location of sampling sites changed over the time (Figure 1; Tables S1 and S2), including the location of reference sites: in the first and second sampling surveys, Manhuaçu River was the reference site, while in the third and fourth sampling surveys the reference site was the Corrente River. The reason for altering the reference site relies on the fact that the sediments from Manhuaçu River presented high levels of As and Mn (Tables S1 and S2), although this site was not influenced by the impacts of the dam rupture.

The sediments were collected using Petersen or Van Veen dredges, at approximately 10 m distance from the river banks. In each site, the superficial layer (up to 10 cm depth) was sampled, and a minimum mass of 2 kg was collected. The sediments were stored in plastic sacs or flasks, which were kept on ice. In laboratory, aliquots for geochemical analyzes were frozen at -20°C, while the aliquots for the exposure bioassays

were kept refrigerated at 4°C. We recognize that the sediments were stored in laboratory for a long-term prior to the bioassays, due to logistic difficulties. However, the international protocols state that the standard storage times (up to 2 months) can be exceptionally extended (USEPA, 2001), especially if the contaminants tend to remain stable and do not degrade: “*Sediments contaminated with relatively stable compounds (...) or those that exhibit moderate-to-high toxicity, do not seem to vary appreciably in toxicity with increased storage time (Moore et al., 1996; DeFoe & Ankley, 1998). Longer term storage might be acceptable in such cases*”). Moreover, DeFoe and Ankley (1998) stated that differences of toxicity along time tended to be mostly determined by biological aspects of the species tested, and that samples stored for longer periods presented lower variation of toxicity. Mudroch and Azcue (1995) showed that sediment cores stored for many months did not presented substantial variation in their geochemical properties. Thus, we assumed that our samples could be tested and produce reliable results.

Exposure Bioassays

The experiments were conducted with young individuals of *Corbicula fluminea*, a filter-feeding bivalve, which is capable to absorb and accumulate metals (Baudrimont et al. 1997; Guimarães and Sígolo, 2008). Its benthic characteristic assures the exposure to metals through the direct contact with the sediment and the ingestion of particles suspended in bottom water (Guo and Feng 2018).

Individuals of *C. fluminea* (about 1 – 2 cm length) were collected at the Ribeira de Iguape River, in Sete Barras (-24.392867; -47.923823), in the southeast of the State of São Paulo. The organisms were placed in thermal boxes and kept wet during the transport to the laboratory, where they were acclimated for 3-5 days in tanks containing water from the collection site. The experiments basically followed the USEPA (1993; 2000)

protocols, with minor adaptations. Not all sediments collected were tested due to the amount of sample needed to meet the criteria of the number of replicates, which would be insufficient; in such cases priority was given to chemical analyzes. Three replicates were prepared for each sediment sample, each consisting of polypropylene flasks of 1.2 L filled with a sediment layer of about 4-cm and dilution water; 10 organisms were introduced in each replicate. The bioassays were conducted in a temperature-controlled room ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), under a photoperiod of 12h:12h (clear/dark), for 14 days, monitored each day to remove dead organisms and check aeration. Each replicate was maintained under gentle aeration, without feeding and water renewal. The bivalves that did not bury within 1h were substituted, and the animals found dead during the experiment were immediately removed. At the end of the exposure interval, the organisms were sacrificed, and their soft tissues were removed, transferred to pre-cleaned cryogenic vials and stored at -70°C in an ultra-freezer. Samples of individuals not exposed to the sediments were taken (prior or after the tests – T0 and T14, respectively), in order to serve as blanks.

Sedimentological analyzes

The sediments of each sampling survey were analyzed together, including their respective references. The sediment grain size distribution was analyzed according to the standard L6.160 (CETESB, 1995). First, each sample was lyophilized, then aliquots were separated whitening the limit of 120 g for each sample. The sediments were then wet sieved through a 0.062 mm mesh, for separating the muddy (silt and clay) fraction. Next, the material retained on the sieve was dried for 48h at 60°C , and, with the aid of a mortar and pestle, they were macerated and then sieved through a set of sieves mounted on a shaker for 20 minutes. The fractions retained on each sieve were weighed to obtain the sandy fractions. The textures of each sediment sample were determined based on Wentworth

(1922) scale and classified according to Shepard (1954). The quantities of organic matter (OM) in the sediments were obtained following the loss-by-ignition method described by Luczak et al. (1997). Sediment aliquots (5g) were dried for 48h at 60°C and then incinerated for 4h at 500°C in a muffle. The OM contents were determined by the difference between the initial and final weights of each sample.

Chemical analyzes

The analysis of metals in sediments was made by the inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), after partial acid digestion, according to the standard SW 846 USEPA 3050b guidelines (USEPA, 1996). Aliquots of sediment samples were dried on a stove at 60°C for 72h; then, 1 g was transferred to tubes kept on a digester block at 95°. 5 ml of HNO₃ (1:1) were added to each tube. Afterwards, 2.5 ml of concentrated HNO₃ were introduced into each tube. After 90 minutes, 1 ml of H₂O₂ and 1.5 ml of ultrapure water (Milli-Q®) were added, and the system remained under rest for 120 minutes. Then, each test tube received 1 ml of H₂O₂ every 15 minutes, till reaching a total of 5 ml of H₂O₂. The tubes remained in the digester block for more than 15 minutes, and after being cooled, the volumes were adjusted to 50 ml with ultrapure water (Milli-Q®). The acid extracts were filtered and kept refrigerated until their use. The following elements were quantified: Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn. The results were compared to the Federal standards for dredged sediments (Brasil, 2012), which establish threshold and probable effect levels for sediments.

The quantification of metals in the soft tissues of *C. fluminea* was performed with the whole organisms, after homogenization. The acid digestion was similar to that used for sediments (USEPA, 1996), and the same elements were analyzed (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn). 0.35 g of each sample was separated in plastic tubes, and then 4

ml of nitric acid were added. After 8h, 1 ml of H₂O₂ (30%) was introduced into each tube, and the system remained resting for 15h. The tubes were transferred to the digester block, where they remained for 3h at 90°C. The extracts were then filtered and the volumes were adjusted to 35 ml by adding ultrapure water Milli-Q®.

The quality assurance / quality control (QA/QC) procedures involved the use of grade reagents, blanks, and analyses of certified reference materials (CRMs). The CRMs used were SS-2 (*EnviroMAT Contaminated Soil*, SCP Science) for sediment and SRM-2976 (*Mussel tissue – Trace elements and methylmercury – freeze/dried do National Institute of Standards and Technology*) for the biological samples. The CRMs were submitted to the same analytical procedure for the respective analyses. All recoveries were within the recommended ranges (USEPA, 1996); such recovery percentages ranged from 90 to 130% for SS-2 and from 88 to 112% for SRM-2976 (Tables S3 and S4). In the analysis of metals in sediments, the limits of quantification (LOQs) were used, while for biological samples, the limits of detection (LODs) were used (Table S5).

The concentrations of metals in sediments and bivalve soft tissues were used to calculate the bioaccumulation factors (BAF) (Arnot and Gobas, 2006), which consist of ratios between the chemical concentration of a determined element in the organisms tissues and in the sediment; BAF values > 1 indicate relevant bioaccumulation (Lee, 1992; Trevizani et al., 2016).

RESULTS

The sediments collected in 2015, just after the disaster, were mostly composed of silt and clay fractions (% of mud ranging between 11.49 and 99.37% - see Tables S4 to S9), with exception of the sample from M2 (upstream to the iron tailing dam), which was composed of very coarse sands. The OM concentration was higher in the sediment from

station J16 (Lower DR), reaching 14.45%. Regarding the second survey, a reduction of muddy (silt and clay) and an increase of sandy fractions were observed (mud levels ranging between 0.08 and 79.2%), as well as a reduction of the OM quantities (ranges between 0 and 10.93%). The sediments from 2019 presented predominance of fine and very fine sands (summer survey), and medium sands (winter survey) and amounts of OM lower than those reported in the previous surveys.

The chemical analyzes indicated higher concentrations (i.e. above background - Vicq et al., 2015) of Al in the sediments from J12, J13, J15 and J16, Mn in M2 and J12, and Fe in M2 and J12, in the 1st sampling (Table S10). As exceeded Level 2 in M2 and Level 1 in the samples J12, J13, J16 and J17). In the 2nd survey (Table S11), sediments from M2 presented levels of Mn above the background, the same occurring for Al in J11. For As, samples from M2 and J1 exceeded Level 2 while the sediment from J11 had concentration exceeding the Level 1. For Cd, concentrations above Level 1 were found in samples from M2, J1 and J11. The sediment from C2 presented concentration of Cr above Level 1. In the 3rd sampling survey (Table S12), only the Reference sediments had Al concentration above the background value, while sediment from J2 presented Mn concentration above the background level. For As, sediment from J2 exceeded Level 2 (Brasil, 2012); while samples from J4 and J11 exceeded the Level 1. The concentration of Cd exceeded the Level 1 in J2, J4, J11 and Reference sediments.

In the 4th sampling (Table S13), many elements presented increased concentrations. The concentration of Fe was higher than the background (Rodrigues et al., 2014) in the Reference sediment, while sediments from J11, J12, J15 and Reference exhibited levels of Al above the background (Vicq et al., 2015). The background level of Mn was exceeded in J2. In that sampling, the As levels exceeded the Level 2 in the samples J2, J4 and J11, and the Level 1 in J12, J15, and Reference. The concentrations of

Cd also tended to be higher in this sampling survey, with Level 2 exceedance in the sample J2 and the sediments from J4, J11, J12, J15, and Reference presenting concentrations above Level 1. The samples from J11, J12, and J15 also had concentrations of Cr exceeding the Level 1, while the samples J4, J11, and J12 presented Ni above level 1. These results show a temporal trend of reducing concentrations of metals in the DRB, but the causes for punctual elevations of the levels of specific elements still need to be determined.

The results obtained in the bioaccumulation tests are presented in the Table 1, while the levels of metals in bivalves not exposed to the sediments are in the Table S14. Regarding the concentration of metals in soft tissues of *C. fluminea* exposed to sediments from the DRB for 14 days, in the first sampling, only two samples could be tested. Ni and Pb were below the detection limits. Iron presented the higher concentrations, followed by Al, Zn, Cu, Mn, Cr, As and Cd. The concentrations were mostly similar in organisms exposed to sediments from M2 and J10, with exception of Mn, which levels were higher in the animals exposed to sediments from M2. The BAF values showed relevant bioaccumulation of Zn in the tissues of animals exposed to M2 only (Table 2). In the 2nd survey, the results exhibit a similar pattern. In general, the levels of Ni and Pb tended to be below the LOD. The concentrations of most elements tended to present relatively low variations, but occasionally high concentrations were detected. However, BAF values indicated relevant bioaccumulation for various elements (Table 2): BAFs > 1 were observed for Cr in Manhuaçu; Cu in most of samples, excepting M2, J11, and C1; Pb in J4; and Zn in M2, J2, J4, J5, J13, and Manhuaçu.

The bioassays made with sediments from the 3rd survey tended to present results similar to those observed in the previous surveys. As, Ni and Pb in *C. fluminea* soft tissues tended to low or undetectable; Cd presented a similar trend. Higher concentrations were

occasional. BAF values were mainly low, and few values were above 1 (Table 2). In this survey, the results suggested a limited bioavailability of metals for the bivalves. Finally, in the tests with sediments from the 4th survey, the results followed the trends exhibited in the previous experiments. The BAF values were low, with exception of those calculated to Cu and Zn in tissues of bivalves exposed to sediments from J16.

Table 1 - Concentrations of metals (mg kg⁻¹) in soft tissues of *Corbicula fluminea* exposed to sediments collected in the Doce River basin, in four sampling surveys.

First Sampling Survey (Dec/2015)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
M2	1.62	0.22	0.53	7.25	6.87	<LOD	<LOD	17.34	91.03	14.65
J10	0.98	0.20	0.56	8.81	2.54	<LOD	<LOD	15.58	93.97	16.37
Second Sampling Survey (Oct-Nov/2016)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
M2	1.41	0.22	0.53	8.90	27.55	<LOD	<LOD	19.00	74.18	6.90
J2	<LOD	0.36	0.60	7.60	3.68	<LOD	0.87	20.01	83.41	6.03
C1	1.19	<LOD	0.51	6.71	1.18	<LOD	<LOD	15.16	46.4	5.27
J4	2.18	0.31	0.68	8.82	1.99	<LOD	1.41	20.75	70.72	7.21
C2	1.73	0.22	1.33	7.85	3.43	1.26	0.78	23.45	142.61	52.16
J5	<LOD	0.29	0.51	6.35	2.00	<LOD	<LOD	18.50	70.01	9.93
J11	1.86	0.23	0.85	9.72	1.59	<LOD	<LOD	16.19	82.54	7.2
J12	1.21	0.22	0.65	8.87	1.73	<LOD	<LOD	16.32	71.94	12.82
J13	1.85	0.30	0.92	9.08	2.94	0.58	0.70	25.68	61.19	12.91
Manhuaçu	1.06	0.27	0.61	7.27	1.67	<LOD	<LOD	20.16	60.24	7.27
Third Sampling Survey (Jan-Feb/2019)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
J2	1.62	0.19	0.48	4.81	14.67	<LOD	0.67	19.45	93.08	11.96
J4	1.62	<LOD	0.64	3.78	1.97	<LOD	<LOD	15.80	76.65	11.08
J11	<LOD	0.17	0.62	4.40	4.02	<LOD	1.07	18.94	122.86	51.93
J12	0.98	<LOD	0.39	5.91	2.63	<LOD	<LOD	20.87	64.74	22.53
J14	1.81	<LOD	0.64	6.12	1.37	<LOD	<LOD	20.69	56.79	10.05
J15	<LOD	0.21	0.58	5.77	11.77	<LOD	<LOD	19.99	176.3	78.96
J16	<LOD	0.19	0.88	4.11	4.88	<LOD	<LOD	19.28	85.57	33.11
REF	<LOD	0.17	0.41	4.9	3.13	<LOD	<LOD	17.14	77.24	34.26
Fourth Sampling Survey (Jul-Aug/2019)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
J2	1.75	0.21	0.48	5.46	15.73	<LOD	<LOD	18.46	91.91	15.23
J4	<LOD	0.22	0.64	4.87	7.76	<LOD	<LOD	20.28	125.79	53.36
J11	<LOD	0.24	0.60	5.44	14.2	0.40	0.79	20.75	123.06	48.25
J12	1.14	<LOD	0.58	6.97	5.1	<LOD	<LOD	19.22	98.04	39.77
J14	0.94	<LOD	0.53	3.58	1.93	<LOD	<LOD	16	55.31	20.58
J15	<LOD	<LOD	0.44	5.78	2.94	<LOD	<LOD	17.9	62.61	16.23
J16	1.46	0.22	0.38	4.13	2.58	<LOD	<LOD	18.75	76.57	10.21
REF	1.37	<LOD	0.6	5.96	3.05	<LOD	<LOD	19.85	116.63	40.4
Maximum Tolerable Limits for Human Consumption										
	1.00 ^a	2.00 ^a	0.50 ^a	30.0 ^b	54.0 ^b	5.0 ^b	1.50 ^a	50.0 ^b	-	-

<LOD below method detection limit.

^a (Anvisa, 2021)

^b (Brasil, 1977)

Table 2 - Bioaccumulation factors (BAF) for soft tissues of *Corbicula fluminea* exposed to sediments from the Doce River basin, after 14 days, considering the four sampling surveys.

First Sampling Survey (Dec/2015)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
M2	0.059	0.127	0.040	0.583	0.001	NC	NC	1.091	0.0009	0.002
J10	0.185	0.184	0.019	0.835	0.006	NC	NC	0.648	0.002	0.002
Second Sampling Survey (Oct-Nov/2016)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
M2	0.059	0.180	0.041	0.439	0.005	NC	NC	1.176	0.001	0.001
J2	NC	NC	0.125	2.726	0.014	NC	0.525	2.395	0.004	0.005
C1	NC	NC	0.023	0.870	0.019	NC	NC	0.666	0.004	0.0007
J4	NC	NC	0.298	5.661	0.027	NC	2.232	3.856	0.009	0.012
C2	0.499	NC	0.033	1.468	0.046	0.112	0.164	0.44	0.007	0.008
J5	NC	0.593	0.116	3.760	0.032	NC	NC	2.870	0.002	0.007
J11	0.203	0.351	0.024	0.804	0.007	NC	NC	0.423	0.002	0.0002
J12	NC	NC	0.037	1.050	0.015	NC	NC	0.595	0.004	0.001
J13	NC	NC	0.102	5.898	0.036	0.234	0.603	3.186	0.013	0.007
Manhuaçu	NC	NC	1.848	7.495	0.051	NC	NC	4.226	0.019	0.003
Third Sampling Survey (Jan-Feb/2019)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
J2	0.055	0.123	0.029	0.178	0.002	NC	0.075	1.026	0.001	0.003
J4	0.261	NC	0.035	0.529	0.006	NC	NC	0.889	0.002	0.001
J11	NC	0.243	0.019	0.694	0.012	NC	0.183	0.737	0.003	0.006
J12	0.255	NC	0.018	0.856	0.021	NC	NC	0.828	0.003	0.002
J14	NC	NC	0.026	0.897	0.005	NC	NC	0.791	0.002	0.0005
J15	NC	NC	0.040	1.625	0.125	NC	NC	1.184	0.010	0.009
J16	NC	NC	0.059	0.987	0.032	NC	NC	0.873	0.005	0.003
REF	NC	0.123	0.017	0.350	0.007	NC	NC	0.246	0.001	0.0006
Fourth Sampling Survey (Jul-Aug/2019)										
Sample	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
J2	0.036	0.041	0.029	0.376	0.001	NC	NC	0.511	0.0003	0.003
J4	NC	0.168	0.023	0.211	0.006	NC	NC	0.532	0.002	0.003
J11	NC	0.154	0.011	0.341	0.011	NC	NC	0.413	0.002	0.002
J12	0.087	NC	0.009	0.306	0.011	NC	NC	0.231	0.001	0.001
J14	0.298	NC	0.033	0.684	0.018	NC	NC	0.771	0.002	0.001
J15	NC	NC	0.012	0.479	0.014	NC	NC	0.358	0.002	0.0004
J16	NC	0.884	0.032	1.616	0.028	NC	NC	1.633	0.005	0.001
REF	0.232	0.089	0.021	0.345	0.004	NC	NC	0.232	0.001	0.001

NC = not calculable

For an in-depth analysis of the bioaccumulation data, the values were compared by those established by the Resolution 42/2013 (ANVISA, 2013), which established maximum limits for metals in food. The concentrations of As exceeded such limits in the most of samples.

DISCUSSION

The disaster involving the Fundão dam is among the worst incidents with mining dams in the history, such as those involving the Córrego do Feijão dam (Ruchkys et al., 2020; Mendes et al., 2022), the Aznalcollar dam, in SW Spain (Domènech et al., 2002; Hudson-Edwards et al., 2003); and two tailings dam failures in Maramureș County, northwest Romania (Macklin et al., 2003). The release of tons of mining tailings from the Fundão dam caused physical changes in sediments of water courses after the coverage by the Fe-rich ore mud (Gomes et al., 2017; Duarte et al., 2021). The consequences of the dam rupture could be initially detected by changes in the sedimentological properties. In the 1st survey, most of sediments presented high quantities of mud (silt and clay). Gomes et al. (2017) also observed predominance of muddy sediments in the Lower DRB after the rupture of the Fundão dam. The predominance of finer sediment particles possibly was due to the presence of tailings, since their texture was of muddy. However, across the DRB, the presence of muddy sediments occasionally can be caused by the influence of contributors. For example, the Casca and Matipó rivers flow into the Doce River, close the station J5, and could contribute with additional amounts of fine sediments to that region (Coelho, 2009). In the 2nd and 3rd surveys, most of the sediments were sandy (with exception of J5 and J11 from the 2nd survey and Reference from the 3rd), while in the 4th survey, all sediments were sandy. Regarding the OM concentrations, the sediments from the 1st and 2nd surveys presented more variable amounts of OM, with peaks above 10%,

especially in the first sampling, made immediately after the Fundão dam rupture. On the other hand, the sediments collected in 2019 (3rd and 4th sampling surveys) tended to present more uniform values, ranging between 5 and 6.9%, with a lack of OM peaks. Our results confirmed that the tailings released immediately altered the physical properties of sediments in the DRB, and also corroborate the results obtained by Gabriel et al. (2021), who reported a reduction of clay and OM quantities in sediments from the Doce River estuary along the time. The dynamic process responsible to transport sediments and tailings downstream are strongly influenced by seasonality, as DRB hydrology depends on the rainfall distribution. Thus, higher river flows occur in the rainy season (November to March), while the dry season (April to September) is characterized by much lower flow rates (Gastão et al, 2022). Possibly the reduction of percentages of silt and clay and OM in sediments from the DRB is a result of natural longer-term processes, but in comparison to data obtained before the dam rupture (Rodrigues et al., 2014), the anterior conditions still were not achieved until 2019.

Regarding the chemical analysis of sediments, the results for the 1st survey showed high concentrations of As, Mn, and Fe in the samples from M2 (actually in the region where the tailings were originally stored, just upstream the Fundão Dam), but higher levels of metals were also detected close to Governador Valadares (sites J12 and J13) and in the lower DRB (sites J15 and J16). Our results differed from those obtained by Hatje et al. (2017), who observed much higher concentrations of metals along the DRB just after the disaster. Increased levels of some elements were also reported by Duarte et al. (2021), who observed that the levels of As and Cd exceeded the national standards (Brasil, 2012), similarly to our findings. The elevation of Fe and Al levels is due to the fact that the tailings stored in the Fundão Dam were constituted by hematite, kaolinite, goethite and quartz, presenting about 60% of Fe, 14% of Si, and 2% of Al (Pires et al., 2003). In

a recent characterization of the tailings, Figueiredo et al. (2020) reported the presence of other elements such as potassium (K), magnesium (Mg), Calcium (Ca), Titanium (Ti), Sodium (Na), Manganese (Mn), Phosphorus (P), and Chromium (Cr).

In the 2nd survey, the concentrations exhibited a trend of reduction, in comparison with the results obtained in the 1st survey. Sediments from M2 still presented As exceeding toxic levels, Cd above toxic thresholds, and Mn above the background levels. In the 3rd survey, the concentrations remained reducing, but the sample J2 (upper DRB) showed contamination by As, Cd, and Mn. However, in the 4th sampling survey, the concentrations of several elements were high and exceeding the legal limits or the regional backgrounds, including the reference which was not influenced by the tailings. The causes of such increase are not totally known, but they may include climatic factors inducing the metals remobilization, deposition of atmospheric contaminants, and other sources of contamination. Vergilio et al (2021) stated that a factor contributing to the increase of metals concentrations in sediments from the lower DRB could be the reduction of the amount of reactive iron oxides in suspended particulate matter, as their deposition would favor the metals' retention in the sediments.

Our results suggest that beyond the ore tailings released after the Fundão dam rupture, other contaminant sources could be contributing, at least locally, to the contamination by metals, corroborating the results of Yamamoto et al. (2022a). Moreover, our results confirmed the literature in indicating that in spite of the reduction of the concentrations of metals in the sediments, there is a persistence of levels above the federal limits or the regional backgrounds, at least for some elements such as As, Mn, Cd, and Al.

The increased levels of metals reported in the 4th survey, suggest that the concentrations of some metals tended to increase downstream, despite the persistence of

high levels in the Upper DRB. However, when analyzing the levels of metals in the DRB, the natural high concentrations of some metals across the basin has to be considered (Rodrigues et al, 2014; Vicq et al., 2015), as well as the historic chronic contamination related with past and current mining activities and steel industry (Santolin et al., 2015; Rodrigues et al., 2014; Duarte et al., 2021). In fact, the soils of across the DRB are naturally Fe-rich and have a predominance of hematite (Rodrigues et al, 2013), while other elements are naturally enriched in the DRB, such as Al, Mn, Cd, Cr, and Ni (Rodrigues et al., 2014; Vicq et al., 2015). Overall, the concentrations reported in our study ranged between those reported before the disaster and those obtained afterwards indicating increased levels for some elements.

The sudden increase of metals concentrations just after the dam failure was related to toxic effects on *Allium cepa* (Quadra et al., 2019). More recently, some authors have suggested that the persistence of high levels of some metals in the DRB could be exposing the biota and producing toxic effects, especially in its estuarine region (Gabriel et al., 2021). Oliveira et al al. (2018) observed that high concentrations of Fe could cause tissue damage in aquatic organisms, while Gabriel et al. (2020) observed bioaccumulation of metals in exposed fish. Furthermore, sediments from the DRB collected 4 years after the dam rupture caused adverse effects on fish embryos (Yamamoto et al, 2022b). A wider study conducted with fishes collected along the DRB concluded that, for different trophic groups, fish showed bioaccumulation, and physiological and histopathological effects, evidencing chronic contamination (Vieira et al., 2022).

Our findings regarding bioaccumulation of metals in soft tissues of *C. fluminea* evidenced the incorporation of some elements, but in a very limited way, as the BAFs tended to be low and only occasionally were considered relevant. Relevant bioaccumulation of Cu and Zn were more frequent (Table 2), but these elements are not

related with the tailings (Figueiredo et al., 2020), and it is well known that bivalves naturally accumulate Cu and Zn in their tissues. In addition, organisms exposed to sediments from Manhuaçu, a reference site not affected by the tailings, exhibited relevant BAFs. Thus, such results need to be considered with some caution. Occasional BAF values >1 occurred in the 2nd sampling for Cr (Manhuaçu) and Pb (J4). Our results evidence a very limited bioavailability of metals during the experiments, with a worse condition in the sediments collected one year after the dam rupture.

The reduced bioavailability of metals to *C. fluminea* is explained by the presence of oxyhydroxides, carbonates and organic carbon (Burton et al., 2019; Huntsman et al., 2019), which are capable to chelate and form complexes with other ions, preventing them to being released. Elements bound to complexed forms of Fe tend to remain in the sediments and tailings (Segura et al, 2016).

Our results show some differences from other studies, which have reported bioaccumulation of metals and adverse effects in aquatic organisms exposed to water or collected at the DRB. Macêdo et al. (2020) exposed fish (*Astyanax lacustris*) to water from the Doce River (sampled in 2018) and observed negative histopathological and molecular effects. Weber et al. (2020) showed that two species of fish collected in the affected portion of Doce River presented biochemical alterations in their livers. Gomes et al. (2019) showed that the water from the Doce River caused genotoxic effects on blood cells of *Geophagus brasiliensis* before the Fundão dam rupture, but the disaster increased such effects. Fish (*A. lacustris*) from the upper DRB exhibited high levels of Fe and Al in their gills, and biochemical alterations (Merçon et al., 2022). Yet, the tailings did not affect the growth of macrophytes (*Egeria densa* and *Chara* sp.), but were capable to interrupt biomass accumulation and disturb primary production (Bottino et al., 2017). On the other hand, Ferreira et al. (2020) found that for the most of elements the levels were

not augmented in fish from the affected sites of DRB, with exception of Hg and As. Passos et al. (2020) observed that elutriates of sediments from the Doce River did not cause adverse effects on *Astyanax lacustris*, possibly because complexing agents present in the sediment. Thus, the bioaccumulation of metals in organisms exposed to waters or sediments from the DRB will depend on multiple factors, such as the matrix (water or sediment) evaluated, such as the species considered and its ability to cope with metals, the form and time of exposure, and the date of the sampling (Ferreira et al., 2020).

The removal of fine sediment particles and their transport downstream, specifically towards the estuarine and coastal environments, suggests that although the riverine environment is being slowly restored to a condition of chronic contamination, similar to that found before the disaster, the coastal ecosystems may be experiencing negative effects due to the increased inputs of contaminated material. Gabriel et al. (2020) showed that the concentrations of many elements in the estuarine sediments are decreasing since 2017, but for Fe, As, Mn, Ni, and Zn, the concentrations remained stable from August 2018, or even have increased, as Cu and Pb, which corroborates our results from winter 2019. The authors also stated their concerns about the potential environmental disturbances that could be caused by the continued input of metals in the estuarine and marine regions. Andrades et al. (2021) reported alteration of fish communities in the estuary of Doce River, in special during the rainy season, when the flow of sediments is increased. In their turn, Vilar et al. (2022) stated that turbidity, pH, and dissolved oxygen were more important variables conditioning the structure of fish communities along the adjacent coastal zone, highlighting that such variables were influenced by the Fundão mining tailings. Nascimento et al. (2022) evidenced that the marine benthic communities from areas adjacent to the mouth of Doce River were disturbed, and the alterations were correlated with the concentrations of Al, V, Ba, iron

mineralogical set (IMS), and percentages of mud. Marine shrimps presented bioaccumulation of metals and biochemical alterations (Maraschi et al., 2022). In their turn, Marques et al. (2022) observed signs of bioaccumulation in marine planktonic communities, highlighting the results for Fe and Mn. In addition, Bernardino et al. (2021) reported chronic effects on microbiological communities, based on eDNA analysis. These impacts seem to continue across the coastal zone adjacent to the river mouth, as evidenced by Bevitório et al. (2022). In this sense, more efforts to monitor the environmental quality and the health of biological communities in the estuary of Doce River and its marine vicinities are necessary.

CONCLUSION

The DRB sediments presented a tendency of reduction of their muddy fractions and organic matter along time, indicating a redistribution of the metal-rich fine materials released by the dam rupture and their transport towards the sea. Comparing the results of the four sampling surveys, the concentrations of metals tended to reduce as well, but increased levels were reported in the winter 2019, including the reference sites. For the most of elements, the concentrations dropped to the ranges observed prior to the dam failure (based on the literature), although the levels of some elements are slightly increased, indicating that the previous conditions were still not reached. In the upper DRB, levels of As, Mn, Fe and Al remain above those reported before the dam rupture. The BAF values were often low, indicating that bioaccumulation of metals in *C. fluminea* is limited and the elements are little or no bioavailable. Particularly elements not related with the tailings presented BAF values >1 , as Zn (1st survey: only in the reference site; 60% cases in the 2nd survey; 25% cases in the 3rd survey, and 12.5% in the 4th survey) and Cu (70% cases in the 2nd survey, and 12.5% in the 3rd and 4th surveys).

Acknowledgments:

We are deeply thankful to the members of the GIAIA (Grupo Independente para Avaliação de Impacto Ambiental), especially Dr. Dante Pavan, and to the NGO SOS Mata Atlântica, also to Drs. Luciana Menezes (Instituto de Pesca) and Flavia Bottino for their support in the sampling efforts (1st and 2nd sampling surveys). We thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support (Research grants #2018/23279-4 and #2016/15229-1). FCP thanks CAPES-FAPEMIG-FAPES-CNPq-ANA for the fellowship (Process #23038.028816/2016-41), and DMSA thanks CNPq for the PQ fellowship. We also thank Letícia Fukushima for the assistance during the laboratorial experiments and Maira Eufrasio for the support with the map preparation.

Author Contribution statement: GFEP led the study and contributed to the study design and conceptualization, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing. ACFC contributed to conceptualization, methodology, laboratory tests, data analysis, and manuscript revising. THT and BSMK contributed to the data acquisition and analysis, and manuscript editing. FSP assisted in the study design, data acquisition and analysis, and manuscript editing. FYY contributed to field sampling, laboratorial testing, data acquisition and interpretation, and manuscript revisions. RCLF contributed to study conceptualization, data acquisition and analysis, and manuscript editing. DA contributed to the concept design, laboratorial experiments, data analysis and interpretation, resources, and manuscript writing.

REFERENCES

- [ANA] Agência Nacional de Águas. 2016. Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG. Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil (Vol. 1). Brasília - DF.
- Andrades R, Martins RF, Guabiroba HC, Rodrigues VLA, Szablak FT, Bastos KV, Bastos PGP, Lima LRS, Vilar CC, Joyeux J-C. 2021. Effects of seasonal contaminant remobilization on the community trophic dynamics in a Brazilian tropical estuary. *Sci Total Environ*, 801: (2021) 149670.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149670>
- Alvarez-Guerra M, Ballabio D, Amigo JM, Bro R, Viguri JR. 2010a. Development of models for predicting toxicity from sediment chemistry by partial least squares-discriminant analysis and counter-propagation artificial neural networks, *Environ*

- Pollut*, 158(2): 607-614, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.007>
- Alvarez-Guerra M, Ballabio D, Amigo JM, Viguri JR, Bro R. 2010b. A chemometric approach to the environmental problem of predicting toxicity in contaminated sediments. *J. Chemometrics*, 24: 379-386. <https://doi.org/10.1002/cem.1264>
- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013. Resolução da Diretoria Colegiada, N. 42, de 29 de agosto de 2013, 1–17. Retrieved from https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.pdf
- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2021. Instrução Normativa - IN nº 88, de 26 de Março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União, 61, Section 1, p. 226. 31/03/2021. Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598> (accessed February 13, 2023).
- Arnot JA, Gobas FAPC. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ Rev*, 14(4): 257–297. <https://doi.org/10.1139/A06-005>
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ Toxicol Chem*, 16(10): 2096–2105. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161016>
- Bernardino AF, Pais FS, Oliveira LS, Gabriel FA, Ferreira TO, Queiroz HM, Mazzuco ACA. 2019. Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA. *PeerJ*, 2019(11): 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.8042>

- Bevitório LZ, da Silva NG, Pirovani JCM, Marques JA, Vieira CED, Zebral YD, Damasceno EM, Lopes LLR, Sant'Ana LP, Marube LC, Costa SR, Martins CMG, Sandrini JZ, Souza MM, Bianchini A, Vale-Oliveira M. 2022. Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. *Mar Pollut Bull*, 177 (April 2022), 113511.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113511>
- Bonnail E, Buruaem LM, Araujo GS, Abessa DMS, DelValls TA. 2016. Multiple biomarker responses in *Corbicula fluminea* exposed to copper in laboratory toxicity test. *Arch Environ Contam Toxicol*, 71(2): 278–285. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00244-016-0281-9>
- Bonnail E, Buruaem LM, Abessa DMS, Sarmiento AM, DelValls TA. 2017. Metal contamination and fractionation in sediments from the lower basin of the Vale do Ribeira (SE, Brazil). *Environ Monit Assess*, 189, 245 (2017).
<https://doi.org/10.1007/s10661-017-5971-x>
- Bonnail E, Buruaem LM, Moraes LG, Araujo GS, Abessa DMS, Sarmiento AM, DelValls TA. 2018. Integrative assessment of sediment quality in lower basin of Ribeira de Iguape River (Brazil). *Environ Geochem Health*, 40: 1465–1480.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10653-017-9996-4>
- Bottino F, Milan JAM, Cunha-Santino MB, Bianchini Jr I. 2017. Influence of the residue from an iron mining dam in the growth of two macrophyte species. *Chemosphere*, 186: 488-494. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.030>
- Brasil, República Federativa. 1977. Portaria nº 56, de 14 de março de 1977. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Saúde, Comissão de Normas e Padrões para alimentos. Brasília, DF. Diário Oficial da União, 22 Mar 1977.

- Brasil, República Federativa. 2012. Resolução CONAMA nº 454, de 01 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. *Diário Oficial da União*, 17.
- Burton GA Jr, Hudson M, Huntsman P, Carbonaro R, Rader KJ, Waeterschoot H, Baken S, Garman ER. 2019. Weight-of-evidence approach for assessing removal of metals from the water column for chronic environmental hazard classification. *Environ Toxicol Chem*, 38: 1839-1849. <http://doi:10.1002/etc.4470>
- Cantillo AY. 1998. Comparison of results of mussel watch programs of the United States and France with worldwide Mussel Watch studies. *Mar Pollut Bull*, 36: 712-717.
- [CETESB] Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 1995. Norma técnica L6.160 de Nov/1995. Sedimentos: determinação da distribuição granulométrica - método de ensaio. São Paulo, 15p.
- Chapman PM, Wang F. 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ Toxicol Chem*, 20(1): 3–22. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200102>
- Chapman PM 1989. Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environ Toxicol Chem*, 8(7): 589–599. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080706>
- Coelho ALN. 2009. Bacia hidrográfica do Rio Doce(MG/ES):uma análise socioambiental integrada. *Rev Geografares*, 7: 131–146. <https://doi.org/10.7147/geo7.156>
- Defoe DL, Ankley GT. 1998. Influence of storage time on toxicity of freshwater sediments to benthic macroinvertebrates. *Environ Pollut*, 99(1): 123-131.
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin, PR, Santore RC. 2001. Biotic

- ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem*, 20(10): 2383-96. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201034>
- Domènech C, Ayora C, Pablo S. 2022. Sludge weathering and mobility of contaminants in soil affected by the Aznalcollar tailing dam spill (SW Spain), *Chem Geol*, 190, (1–4): 355-370, [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(02)00125-0)
- Duarte EB, Neves MA, de Oliveira FB, Martins ME, de Oliveira CHR, Burak DL, Orlando MTD, Rangel CVGT. 2021. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. *Chemosphere*, 262, 127879. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- Escobar H. 2015. Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. *Science*, 350(6265): 1138–1139. <https://doi.org/10.1126/science.350.6265.1138>
- Ferreira FF, de Freitas MBD, Szinwelski N, Vicente N, Medeiros LCC, Schaefer CEGR, Dergam JA, Sperber CF. 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*, 16(5), 622–630. <https://doi.org/10.1002/ieam.4289>
- Figueiredo MD, Lameiras FS, Ardisson JD, Araujo MH, Teixeira APdC. 2020. Tailings from Fundão Tragedy: Physical–Chemical Properties of the Material That Remains by Candonga Dam. *Integr Environ Assess Manag*, 16: 636-642. <https://doi.org/10.1002/ieam.4227>
- Gabriel FÂ, Hauser-Davis RA, Soares L, Mazzuco ACA, Rocha RCC, Saint Pierre TD, Saggiaro E, Correia FV, Ferreira TO, Bernardino AF. 2020. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ*, 8:e10266, <https://doi.org/10.7717/peerj.10266>

Gabriel F, Ferreira AD, Queiroz HM, Vasconcelos ALS, Ferreira TO, Bernardino AF.

2021. Long-term contamination of the Rio Doce estuary as a result of Brazil's largest environmental disaster. *Perspect Ecol Conserv*, 19(4): 417–428.

<https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.09.001>

Gastão FGC, Lima-Júnior SB, Leal CA, Maia LP. 2022. Hidrologia da Bacia

Hidrográfica do Rio Doce no Estado do Espírito Santo, Brasil. William Morris

Davis - Rev Geomorfologia, 3(2): 1-19. [https://doi.org/10.48025/ISSN2675-](https://doi.org/10.48025/ISSN2675-6900.v3n2.2022.159)

6900.v3n2.2022.159

Gomes LE de O, Correa LB, Sá F, Neto RR, Bernardino AF. 2017. The impacts of the

Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. *Mar Pollut*

Bull, 120(1–2): 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.056>

Guimarães V, Sígolo JB. 2008. Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora

(*Corbicula fluminea*) - Rio Ribeira de Iguape - SP. *Quim Nova*, 31(7): 1696–1698.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700018>

Guo X, Feng C. 2018. Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*)

to pollutants in surface water and sediment. *Sci Total Environ*, 631–632: 56–70.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.019>

Hatje V, Pedreira RM, Rezende CE, Schettini CAF, Souza GC, Marin DC, Hackspacher

PC. 2017. The environmental impacts of one of the largest tailings dam failures

worldwide. *Sci Rep*, 7(1):1–13.

Hudson-Edwards KA, Macklin MG, Jamieson HE, Brewer PA, Coulthard TJ, Howard

AJ, Turner JN. 2003. The impact of tailings dam spills and clean-up operations on

sediment and water quality in river systems: the Ríos Agrio–Guadamar,

Aznalcóllar, Spain, *Appl Geochem*, 18(2): 221-239, [https://doi.org/10.1016/S0883-](https://doi.org/10.1016/S0883-101)

- Huntsman P, Beaudoin R, Rader K, Carbonaro R, Burton GA Jr, Hudson M, Baken S, Garman E, Waeterschoot H. 2019. Method development for determining the removal of metals from the water column under transformation/dissolution conditions for chronic hazard classification. *Environ Toxicol Chem*, 38: 2032-2042. <http://doi:10.1002/etc.4471>
- [IGAM] Instituto Mineiro de Gestão das Águas. 2015. Acompanhamento da Qualidade das Águas do Rio Doce Após o Rompimento da Barragem da Samarco no distrito de Bento Rodrigues – Mariana/MG.
- [IGAM] Instituto Mineiro de Gestão das Águas. 2017. Encarte Especial Sobre a Qualidade das Águas do Rio Doce após 2 Anos do Rompimento de Barragem de Fundão -2015/2017, 2. Retrieved from <http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/sala-de-situacao/rio-doce/documentos-relacionados/encarte-qualidade-da-gua-do-rio-doce-dois-anos-apos-rompimento-de-barragem-de-fundao-1.pdf>
- Lee H. 1992. Methods for Assessing Sediment Bioaccumulation in Marine/ Estuarine Benthic Organisms. National Sediment Bioaccumulation Conference, 11–23.
- Luczak C, Janquin MA, Kupka A. 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, 345(1): 87–94. <https://doi.org/10.1023/A:1002902626798>
- Macêdo AKS, Santos KPE, Brighenti LS, Windmüller CC, Barbosa FAR, Ribeiro RIMA, Santos HB, Thomé RG. 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Sci Total Environ*, 735. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>

Macklin MG, Brewer PA, Balteanu D, Coulthard TJ, Driga B, Howard AJ, Zaharia S.

2003. The long term fate and environmental significance of contaminant metals released by the January and March 2000 mining tailings dam failures in Maramureş County, upper Tisa Basin, Romania, *Appl Geochem*, 18(2): 241-257, [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00123-3)

Maraschi AC, Marques JA, Costa SR, Vieira CED, Geihs MA, Costa PG, Martins

CMG, Sandrini JZ, Bianchini A, Souza, MM. 2022. Marine shrimps as biomonitors of the Fundão (Brazil) mine dam disaster: A multi-biomarker approach. *Environ Pollut*, 305, 15 July 2022, 119245. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119245>

Marques JA, Costa SR, Maraschi AC, Vieira CED, Costa PG, Martins CMG, Santos

HF, Souza MM, Sandrini JZ, Bianchini A. 2022. Biochemical response and metals bioaccumulation in planktonic communities from marine areas impacted by the Fundão mine dam rupture (southeast Brazil). *Sci Total Environ*, 806, 150727. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150727>

Mendes RG, Valle Junior RF, Silva MMAPM, Fernandes GHM, Fernandes LFS,

Fernandes ACP, Pissarra TCT, Melo MC, Valera CA, Pacheco FAL. 2022. A partial least squares-path model of environmental degradation in the Paraopeba River, for rainy seasons after the rupture of B1 tailings dam, Brumadinho, Brazil, *Sci Total Environ*, 851(Part 1), 158248, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158248>

Merçon J, Cabral DS, Teixeira BC, Pereira TM, Bona AM, Armini CVL, Agostinho

SGDN, Vasconcelos CM, Gomes LC. 2022. Seasonality effects on the metal concentration and biochemical changes in *Astyanax lacustris* (Teleostei:

- Characiformes) from Doce River after the collapse of the Fundão dam in Mariana, Brazil. *Environ Toxicol Pharmacol*, 89, Jan 2022, 103777.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103777>
- Moore DW, Dillon TM, Gamble EW. 1996. Long-term storage of sediments: Implications for sediment toxicity testing. *Environ Pollut*, 89: 341-342.
- Mudroch A, MacKnight SD. 1994. *CRC Handbook of Techniques for Aquatic Sediment Sampling*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 210 pp.
- Nascimento FJA, Svendsen C, Bradshaw C. 2015. Combined Effects from γ Radiation and Fluoranthene Exposure on Carbon Transfer from Phytoplankton to Zooplankton. *Environ Sci Technol*, 49(17): 10624–10631.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03128>
- Oliveira LF, Santos C, Risso WE, Martinez CBR. 2018. Triple-mixture of Zn, Mn, and Fe increases bioaccumulation and causes oxidative stress in freshwater neotropical fish. *Environ Toxicol Chem*, 37(6): 1749–1756. <https://doi.org/10.1002/etc.4133>
- Passos LS, Gnocchi KG, Pereira TM, Coppo GC, Cabral DS, Gomes LC. 2020. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? *Sci Total Environ*, 736, 139644. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>
- Pereto C, Coynel A, Lerat-Hardy A, Gourves P-Y, Schäfer J, Baudrimont M. 2020. *Corbicula fluminea*: A sentinel species for urban Rare Earth Element origin. *Sci Total Environ*, 732, 25 August 2020, 138552.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138552>
- Pires JMM, Lena JC, Machado CC, Pereira RS. 2003. Potencial poluidor de resíduo

sólido da Samarco Mineração: Estudo de caso da Barragem de Germano. *Rev Árvore*, 27(3): 393-397.

Quadra GR, Roland F, Barros N, Malm O, Lino AS, Azevedo GM, Thomaz JR, Andrade-Vieira LF, Praça-Fontes MM, Almeida RM, Mendonça RF, Cardoso SJ, Guida YS, Campos JMS. 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>

Quaresma VS, Aguiar VMC, Bastos AC, Oliveira KS, Vieira FV, Sá F, Baptista Neto JA. 2021. The impact of trace metals in marine sediments after a tailing dam failure: the Fundão dam case (Brazil). *Environ Earth Sci*, 80(17).
<https://doi.org/10.1007/s12665-021-09817-x>

Queiroz HM, Ying SC, Abernathy M, Barcellos D, Gabriel FA, Otero XL, Nóbrega GN, Bernardino AF, Ferreira TO. 2021. Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. *Environ Int*, 146 (August 2020).
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106284>

Rodrigues ASL, Malafaia G, Costa AT, Nalini HA. 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. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-1799-4>

Rodrigues ASL, Malafaia G, Costa AT, Nalini Júnior HA. 2014. Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte River basin, Minas Gerais State, Brazil. *Environ Earth Sci*, 71: 4177–4186

Ruchkys ÚA, Castro PTA, Ribeiro SMC, Alvarenga LJ. 2020. Applying geoethics to the context of mining ferruginous geosystems: case studies from the tailing dam

- breaks in Fundão and Córrego do Feijão, Minas Gerais - Brazil. *Episodes*, 43(4): 981-990. <https://doi.org/10.18814/epiiugs/2020/020060>
- Santolin CVA, Ciminelli VST, Nascentes CC, Windmüller CC. 2015. Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. *Environ Earth Sci*, 74(2), 1235–1248. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4115-2>
- Segura FR, Nunes EA, Paniz FP, Paulelli ACC, Rodrigues GB, Braga GÚL, Pedreira Filho, WR, Barbosa Jr F, Cerchiaro G, Silva FF, Batista BL. 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environ Pollut*, 218: 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>
- Shepard FP. 1954. Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. *J Sediment Petrol*, 24(3): 151–158. <https://doi.org/10.1097/00006534-195409000-00011>
- Trevizani TH, Figueira RCL, Ribeiro AP, Theophilo CYS, Majer AP, Petti MAV, Corbisier TN, Montone RC. 2016. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Mar Pollut Bull*, 106(1–2): 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.056>
- [USEPA] United States Environmental Protection Agency. 1993. Guidance Manual: Bedded Sediment Bioaccumulation Tests. USEPA, Washington, EPA/600/R-93/183. 246p.
- [USEPA] United States Environmental Protection Agency. 1996. Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf>

- [USEPA] United States Environmental Protection Agency. 2000. Bioaccumulation Testing and Interpretation for the Purpose of Sediment Quality Assessment: status and needs. USEPA, Washington. EPA-823-R-00-001, 136p.
- [USEPA] United States Environmental Protection Agency. 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses. Technical Manual. USEPA, Washington, DC, EPA-823-B-01-002.
- Vergilio CS, Lacerda D, Souza TS, Oliveira BCV, Fiorese VS, Souza VV, Rodrigues GR, Barbosa MKAM, Sartori E, Rangel TP, Almeida DQR, Almeida MG, Thompson F, Rezende CE. 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143697>
- Vicq R, Matschullat J, Leite MGP, Nalini Junior HA, Mendonça FPC. 2015. Iron Quadrangle stream sediments, Brazil: geochemical maps and reference values. *Environ Earth Sci*, 74(5): 4407–4417. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4508-2>
- Vidal CC, Andrades R, Szablak FT, Guabiroba HC, Pichler HA, Bastos KV, Lima LRS, Bastos PGP, Martins RF, Rodrigues VLA, Hostim-Silva M, Joyeux J-C. 2022. Variability in nearshore fish biodiversity indicators after a mining disaster in eastern Brazil. *Mar Environ Res*, 175, March 2022, 105565. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105565>
- Vidigal THDA, Marques MMGSM, Lima HP, Barbosa FAR. 2005. Gastrópodes e bivalves límnicos do trecho médio da bacia do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana*, 6(supplement): 67-76 <https://www2.icb.ufmg.br/lundiana/Contents/full/vol6sup2005/14.pdf> (accessed

October 10, 2022).

Vieira CED, Marques JA, Silva NG, Bevitório LZ, Zebral YD, Maraschi AC, Costa SR, Costa PG, Damasceno EM, Pirovani JCM, Vale-Oliveira M, Souza MM, Martins CMG, Bianchini A, Sandrini JZ. 2022. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. *Sci Total Environ*, 832(March).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>

Vieira F. 2009. Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MGBiota*, 2(5), 5–22. Retrieved from http://ief.mg.gov.br/images/stories/MGBIOTA/mgbiota11/mgbiot_v.2n.5.pdf#page=5

Weber AA, Sales CF, Faria FS, Melo RMC, 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. *Ecotoxicol Environ Saf*, 190(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>

Wentworth CCK. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J Geol*, 30(5): 377–392. <https://doi.org/10.2307/30063207>

Yamamoto FY, Souza ATC, Carvalho de Paula, VCS, Beverari I, Garcia JRE, Padial AA, Abessa DMS. 2022a. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Sci Total Environ*, 846(March), 157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>

Yamamoto FY, Eufrásio GF, Nascimento LS, Fernandes GM, Santos MP, Kim BSM, Figueira RCL, Cavalcante RM, Grassi MT, Abessa DMS. 2022b. Chemical Data of Contaminants in Water and Sediments From the Doce River Four Years After

the Mining Dam Collapse Disaster. *Data in Brief* 45, December 2022, 108715,
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108715>

Zuykov M, Pelletier E, Harper DAT. 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies:
From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*, 93(2), 201–208.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001>

Capítulo 3 - Análises de biomarcadores e bioacumulação a partir da exposição de *Corbicula fluminea*. Artigo em elaboração referente à bolsa Fapesp processo 2018/23279-4.

Biochemical effects in bivalves exposed to sediments from the Rio Doce basin after the Fundão Dam failure

Guacira de F. E. Pauly ^a; Isabella Beverari Couto ^a; Thaisa Ralha Rodrigues ^a; Ana Carolina Feitosa Cruz ^a; Caio Cesar Ribeiro ^a; Mayana C. Fontes ^b; Paloma Gusso-Choueri ^c; Denis M. S. Abessa ^a.

^a Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista, São Vicente-SP, Brasil

^b Universidade Federal de São Paulo – Campus Baixada Santista

^c Universidade Santa Cecília – Unisanta

Resumo

Os impactos ambientais causados pela urbanização e intensa atividade mineradora se estendem por todo curso d'água da bacia do Rio Doce. No dia 05 de novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de Fundão, no município de Mariana (MG), onde milhões de m³ de rejeitos de minério de ferro foram liberados, tornando-se o maior desastre ambiental da história Brasil, até o momento. Este trabalho visou avaliar efeitos bioquímicos em indivíduos de *Corbicula fluminea* expostos a sedimentos coletados no Rio Doce, em 2015, 2016, e 2019 (estação chuvosa e seca). Foram medidas concentração de glutathiona reduzida (GSH), atividades de glutathiona-S-transferase (GST) e glutathiona peroxidase (GPx), danos em DNA, peroxidação lipídica (LPO), atividade de acetilcolinesterase (AChE), e concentração de metalotioneínas (MET). Conforme a FA/PCA, os organismos apresentaram diminuição da atividade de AChE para algumas amostras de sedimentos coletadas em 2019, não associada ao rejeito de mineração. No geral, foi observada alta capacidade de depuração e baixa biodisponibilidade dos metais. Palavras-chave: bioacumulação, *C. fluminea*, biomarcadores, metais, AChE

Introdução

A exploração dos recursos minerais no Brasil ocorre há pelo menos 3 séculos, de modo que o setor possui forte influência no estabelecimento de fronteiras e na ocupação territorial do país, além de um papel importante na economia (Farias, 2002). Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de minério de Fe do mundo, obtendo uma posição de destaque no mercado global (Salvador et al., 2020).

No estado de Minas Gerais (MG), localizado na região sudeste do país, a indústria extrativista mineradora tem explorado recursos naturais desde fins do século XVII (Coelho, 2012), inclusive dando nome ao estado. A região do Quadrilátero Ferrífero (QF), se destaca pela significativa extração de minérios de ferro, alumínio, manganês e ouro (Rhodes, 2010; Hatje et al., 2017). Historicamente, os impactos diretos e indiretos da intensa atividade de mineração incluem mudanças drásticas na paisagem através da instalação das minas e da construção de barragens e infraestruturas adjacentes, como estradas e portos; alterações das características do solo; supressão vegetal, contaminação dos corpos d'água e do solo; danos aos organismos, resultando na diminuição da biodiversidade devido à poluição (Hatje et al., 2017; Siqueira-Gay et al., 2020); alta demanda de água e energia; geração e lançamento no ambiente de efluentes associados a produção e a deposição de rejeitos; implicações à saúde humana, como aumento da taxa de doenças respiratórias (Nkosi, 2018) ou exposição aos metais que podem causar comprometimento das funções neurológicas (Taylor et al., 2014).

A bacia hidrográfica do Rio Doce, cujas nascentes estão localizadas no setor leste do QF, vem recebendo diversos impactos ambientais decorrentes tanto da urbanização, principalmente pelo baixo número de cidades com sistema de tratamento de esgoto, quanto das atividades econômicas diversas, como a agropecuária, indústrias (celulose e siderúrgica) e mineração (principalmente de ferro), predominantemente nas regiões do Vale do Aço, Colatina e Linhares. Algumas das atividades industriais importantes na região são o complexo siderúrgico da Usiminas e a companhia de mineração Samarco Mineração S.A. que pertence a duas outras grandes corporações, a Vale e a anglo-australiana BHP Billiton (Consórcio Ecoplan Lume, 2010; Espindola et al., 2019).

No dia 05 de novembro de 2015, no município de Mariana (MG), ocorreu o rompimento da barragem de Fundão, de responsabilidade da Samarco (Losekann et al., 2020) liberando uma onda contendo milhões de m³ de minério de ferro liquefeito na forma de lama, a qual destruiu o pequeno distrito de Bento Rodrigues, soterrando as áreas

ribeirinhas adjacentes, matando 19 pessoas (MB, 2019) e deixando mais de 600 desabrigados (GFT, 2015). A falha da barragem resultou no maior desastre socioambiental da história brasileira (Escobar, 2015), até então. Estima-se que, mais de 50 milhões de m³ de resíduos de mineração de minério de ferro foram lançados no ambiente e percorreram mais de 650 km pelos rios Gualaxo do Norte, Carmo e Doce até atingir o seu estuário, localizado no distrito de Regência, na cidade de Linhares – Espírito Santos (ES) e, posteriormente, o Oceano Atlântico (IBAMA, 2015; INPE, 2015; Carmo et al., 2017).

No oceano, as correntes oceânicas espalharam os sedimentos por diversos habitats marinhos costeiros, tendo impactado áreas protegidas marinhas como a APA Costa das Algas, o Refúgio da Vida Silvestre de Santa Cruz, a Reserva Biológica de Comboios (Thomé et al., 2016) e até mesmo recifes de corais de Abrolhos (Fernandes et al., 2016; Mazzei et al., 2017; Miranda & Marques, 2016; Cardoso et al., 2022).

Alguns estudos sobre a química do sedimento impactado pelo rejeito de mineração demonstraram, além do Fe, altos níveis de arsênio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni) e alumínio (Al) (IGAM, 2015; Segura et al., 2016; Queiroz et al., 2018). O aumento das concentrações de uma mistura de metais, após o rompimento da barragem, tem sido reportado com preocupação devido ao caráter persistente dos contaminantes metálicos em água e sedimentos, pois não são destruídos, possuindo alta capacidade de bioacumulação, e podendo causar efeitos negativos na comunidade aquática (Luoma & Rainbow, 2005).

Geralmente, a abordagem mais direta para determinar o grau de poluição de um corpo d'água é a análise química das águas superficiais e/ou dos sedimentos. Entretanto, estas análises não fornecem as evidências integradas da possível toxicidade sobre os organismos (Graney et al., 1989; Zhou et al., 2008; Guo & Feng, 2018). Para avaliar adequadamente os efeitos biológicos dos contaminantes ambientais, como os metais, as abordagens mais frequentemente usadas são os testes de toxicidade e os biomarcadores. Estes últimos têm sido utilizados para avaliar os efeitos adversos em diferentes níveis de organização biológica (Abessa, 2016), e podem ser definidos como respostas moleculares, bioquímicas, fisiológicas ou histológicas mensuráveis que indicam a presença de xenobióticos no ambiente (Monserat et al., 2007). Uma de suas características mais importantes é o potencial de antecipar as mudanças em níveis superiores de organização biológica (Cajaraville et al., 2000) e sua maior vantagem é a

rápida resposta, portanto, sua capacidade preditiva de efeitos tardios, sendo importantes para avaliar a qualidade ambiental (Van Der Oost et al., 1996; Dinan et al., 2001).

Os biomarcadores podem ser divididos em biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito. Biomarcadores de exposição fornecem informações sobre a exposição do organismo ao xenobiótico, através da quantificação do produto da interação entre o contaminante e a célula alvo. Já os biomarcadores de efeito fornecem informações sobre alterações bioquímicas e fisiológicas, com prejuízos à saúde do organismo (Van Der Oost, et al., 1996, WHO, 1993). No caso de contaminantes orgânicos, a assimilação e depuração envolvem reações químicas que podem ser divididas em fase I e fase II, e visam tornar os contaminantes solúveis para depois serem excretados. Na fase I ocorre a biotransformação dos xenobióticos a partir de reações de oxirredução, como por exemplo aquelas realizadas pelo sistema citocromo P450. Na fase II ocorre a conjugação de moléculas endógenas aos xenobióticos, no qual um conjunto de enzimas adicionam compostos aos poluentes, através de reações químicas, visando solubilizar os contaminantes e assim facilitar sua eliminação do organismo (van der Oost, et al., 1996; Bonnail et al., 2018).

O funcionamento dos sistemas de biodepuração gera, como subproduto, moléculas como as espécies reativas de oxigênio (ROS), extremamente instáveis, pois reagem com estruturas proteicas e lipídeos, causando danos celulares. Assim, essas espécies reativas de oxigênio passam por um processo de neutralização dentro dos organismos, através da atuação de enzimas antioxidantes ou de ligantes bioquímicos capazes de inativar as ROS (Bonnail, et al., 2016). Duas dessas enzimas são glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), havendo também um papel da glutathione reduzida (GSH) como agente capaz de sequestrar as ROS e evitar seus efeitos sobre os organismos expostos (Van Der Oost, et al., 1996).

A GSH é capaz de remover ROS do meio intracelular a partir dos grupos sulfidrilas presentes em sua estrutura. Assim, a GSH é alterada em sua forma oxidada (GSSG) e logo após é regenerada pela Glutathione Redutase (GR), que utiliza a energia da transformação de um NADPH em NADP⁺ para a quebra da ligação dissulfeto (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001). A GST (Glutathione-S-Transferase) representa uma família de enzimas encontradas em formas diméricas, onde cada dímero possui sítios ativos específicos: um sítio de ligação específico para a glutathione e outro específico para ligação ao substrato, catalisando a conjugação da GSH com o poluente, visando torná-lo mais solúvel (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001). Por fim, a GPx participa do controle das

ROS através da incorporação de uma selenocisteína em seu sítio ativo, promovendo a detoxificação, a partir da oxidação da GSH em GSSG (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001). A exposição a um contaminante induz o aumento de ROS, podendo gerar estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre as moléculas pró-oxidantes e o sistema antioxidante, causando danos em DNA, peroxidação lipídica (LPO), alteração de atividades de enzimas como acetilcolinesterase (AChE) (Bonnail et al., 2018). A acetilcolinesterase é uma enzima que atua na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, prevenindo a superestimulação pós-sináptica. Sua atividade enzimática pode ser inibida por compostos como os metais, através da sua característica de alta sensibilidade, que permite a verificação dos efeitos primários da contaminação nos organismos, incluindo os moluscos bivalves (Albuquerque, 2007; Azevedo et al., 2021; Santos et al., 2022).

Um outro grupo de proteínas que pode ser utilizado como biomarcador são as metalotioneínas (MTs). Essas proteínas de baixo peso molecular possuem grandes quantidades de cisteína (aproximadamente 30%) em suas moléculas e funcionam como ligantes aos metais. Devido a essas características, as metalotioneínas estão frequentemente envolvidas na detoxificação e regulação de elementos metálicos no interior das células de organismos vertebrados e invertebrados (Albuquerque, 2007; Azevedo et al., 2021).

O uso de espécies sentinelas (bioindicadores) tem sido tradicionalmente aplicado em estudos de biomonitoramento, incluindo avaliação de risco ambiental (Friberg et al., 2011). Dentre os organismos sésseis, os bivalves são comumente utilizados, uma vez que estão em contato direto tanto com os compartimentos contaminados, quanto com as substâncias dissolvidas na água (Doherty, 1990; Santos & Martinez, 2014) ou ligadas a partículas em suspensão (Fournier et al., 2005) e, portanto, podem bioacumular quantidades elevadas de metais em seus tecidos (Bonnail et al., 2018). Devido à sua rápida resposta às alterações ambientais, moluscos da espécie *Corbicula fluminea* têm sido propostos como excelente bioindicadores de poluição ambiental (Zhou et al., 2008). As medidas de danos em DNA, de peroxidação lipídica e da atividade de enzimas do sistema antioxidante são alguns dos exemplos de biomarcadores bioquímicos utilizados para avaliar e monitorar a qualidade ambiental em bivalves (Bonnail et al., 2016; Aguirre-Martinez et al. 2018). *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) é um bivalve asiático, invasor, encontrado no mundo todo, em diversos ambientes de água doce, conhecido pela facilidade de acumular metais em seus tecidos, sendo bastante utilizado em estudos de impacto ambiental por substâncias químicas ao redor do mundo (Abaychi & Mustafa,

1988). Dessa forma, medir respostas de biomarcadores em *C. fluminea* expostos em sedimentos influenciados pelo desastre de Mariana (MG), poderá fornecer informações sobre a poluição dos sedimentos do ambiente afetado.

Objetivos

Este trabalho visou avaliar as respostas bioquímicas (dano em DNA, peroxidação lipídica - LPO, atividades de GPx, GST, e AChE, e níveis de GSH e Metalotioneínas - MT), em indivíduos de *C. fluminea* expostos a sedimentos coletados no Rio Doce após a liberação massiva de rejeitos de mineração e integrar os resultados dos efeitos com os dados das análises químicas dos sedimentos aos quais os animais foram expostos.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar as concentrações químicas de As, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, Fe e Al em sedimentos coletados ao longo da Bacia do Rio Doce entre 2015 e 2019 (capítulo 1).
- Avaliar atividades de biomarcadores de exposição GST e GPx e teores de GSH e metalotioneínas em partes moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos coletados ao longo da Bacia do Rio Doce entre 2015 e 2019.
- Avaliar biomarcadores de efeito como níveis de danos em DNA, peroxidação lipídica, e atividade da enzima acetilcolinesterase em partes moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos coletados ao longo da Bacia do Rio Doce entre 2015 e 2019.
- Avaliar se a bioacumulação de metais tem relação com as respostas dos biomarcadores nos organismos expostos;
- Integrar as respostas de análises químicas de metais em sedimentos com as respostas de biomarcadores nos organismos expostos.

Materiais e métodos

A utilização da espécie filtradora *C. fluminea* nos ensaios laboratoriais se baseia no fato de serem organismos com grande capacidade de bioacumular contaminantes, além de estarem em contato tanto com o sedimento quanto com as partículas em suspensão na água próxima ao substrato (Abessa, 2016; Guo & Feng, 2018), podendo revelar os efeitos cumulativos ambientais (Rocha & Souza, 2012). Além disso, esta espécie responde de forma muito similar às espécies nativas, permitindo extrapolar os resultados para espécies da fauna brasileira (Abessa, 2016). Adicionalmente, a utilização de *C. fluminea* não acarreta danos ecológicos às populações de espécies nativas, sendo um importante aspecto por muitas destas já se encontrarem em algum grau de ameaça.

Para a realização dos ensaios de exposição de *C. fluminea* aos sedimentos, foram coletados organismos no Rio Ribeira de Iguape, na região do município de Sete Barras, região sudeste do estado de São Paulo. O Rio Ribeira de Iguape nasce no estado do Paraná e desemboca no complexo estuarino-lagunar do Lagamar e próximo da Ilha Comprida (litoral sul de São Paulo) (Nascimento Jr et al., 2008). A bacia do rio Ribeira é rica em Al, Mn e Fe, tendo sofrido também a influência de antigas atividades de mineração (Abessa et al., 2012). Na região de Sete Barras o Rio Ribeira de Iguape apresenta um perfil meandrante, com menor energia e vazão média de 278,78 m³/s, apresentando maiores índices pluviométricos entre novembro e março (Abessa, 2016; Santana 2008). As coletas foram realizadas na estação seca, entre junho e setembro, quando o nível do rio é mais baixo e a vazão é menor. Os organismos coletados foram colocados em caixas térmicas com capacidade de 50L, contendo sedimento e água do local de coleta e transportados ao laboratório, onde foram aclimatados em tanques plásticos por 5 a 7 dias até a realização do experimento.

Para os ensaios de exposição foram preparadas três réplicas de cada amostra, em frascos de polipropileno com capacidade de 1L. Foram colocados cerca de 4 cm de sedimento e 800 ml de água em cada frasco, mantidos a 25°C durante 24h, e com aeração para a estabilização do sistema. Depois, 10 organismos foram transferidos para cada réplica e o experimento seguiu conduzido em sala aclimatada (25°C $\pm$ 2) e fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro), sob aeração suave e constante, por quatorze dias, sem renovação. Os organismos que não se enterraram na primeira hora do experimento foram substituídos e os indivíduos mortos durante o ensaio foram removidos diariamente, após exame dos frascos realizado pela manhã e ao fim da tarde. Não foi adicionada alimentação suplementar para os organismos durante o experimento. Ao final do período de exposição, os organismos foram sacrificados através de choque térmico, para extração dos tecidos (partes moles). Também foram medidos os valores de pH e oxigênio da água no início e no final da exposição dos organismos.

Os tecidos extraídos dos organismos foram divididos em duas alíquotas em diferentes microtubos, uma para que pudesse ser realizadas as análises químicas das concentrações de metais nos tecidos e outras análises de biomarcadores. Ambas as frações foram armazenados em ultrafreezer a -70°C.

As frações granulométricas dos sedimentos foram analisadas de acordo com os padrões da L6.160 (CETESB, 1995), onde as texturas dos sedimentos foram determinadas de acordo com a escala de Wentworth (1922) e classificadas de acordo com Shepard

(1954). A quantidade de matéria orgânica foi obtida seguindo o método de Luczak et al. (1997). Para as análises químicas de metais nos sedimentos, primeiramente foi feita a digestão ácida parcial seguindo o procedimento SW 846 USEPA 3050b (USEPA, 1996), conforme descrito em detalhe no capítulo 1. Em seguida, os metais Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram quantificados por espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (USEPA 1996). Para quantificação dos metais em tecidos de *C. fluminea*, foi utilizado o mesmo método de digestão ácida realizado para os sedimentos (USEPA, 1996), onde os mesmos metais foram analisados (As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, Fe e Al), como estabelecidos no capítulo 2.

Para a análise de biomarcadores, primeiramente foi determinado o teor de proteínas totais, de acordo com o protocolo de Bradford (1976). As amostras dos tecidos moles internos retirados dos organismos foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em solução tampão TRIS 50 mM; EDTA 1mM; DTT 1mM; Sacarose 0,5M; KCl 0,15M; PMSF 30mM, na razão 1:4 (w/v), e o pH ajustado a 7,6. A homogeneização foi realizada em 2 ciclos de 20min em velocidade de 42600 RPM e para as proteínas centrifugadas foi utilizada centrífuga a 9000rpm, à 4°C por 30 minutos. Assim, o sobrenadante pode ser transferido em um novo microtubo, e mantido à -80°C.

A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de 2mgL^{-1} de Albumina Soro Bovino (BSA) diluída em água Mili-Q® em placa transparente (96 poços). Para a quantificação de proteínas, foram pipetados, na mesma placa da curva de calibração, 5 μL de cada amostra diluída em tampão de homogeneização, em duplicata, e adicionados 180 μL do reagente Bradford, assim, cada placa foi incubada por 20min. e a leitura de absorbância foi realizada em 595nm. Os resultados foram expressos em mg.mL^{-1} .

Para realização dessas análises, foram utilizados 2mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1mM de GSH como substrato. O S-2,4-dinitrofenilglutationa formado pela reação foi quantificado pelo aumento da absorbância a 340nm a 30°C a cada 30 segundos durante 3 minutos em microplaca transparente, sendo os resultados expressos em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína total. A solução tampão foi preparada pela junção de duas soluções prévias: as soluções de pH básico, a partir da diluição de 6,9672g de K_2HPO_4 em 400mL de água Mili-Q e a solução de pH ácido, a partir de KH_2PO_4 diluídos em 400mL de água Mili-Q. A solução do meio de reação pH 6,5, tendo sido feita pela mistura inicial de 0,02g de CDNB em 500 μL de etanol, então a solução resultante foi

adicionada à outra composta por 0,24g de Hepes (10 mM), 0,03 g GSH (1mM) e 0,73g de NaCl (125mM) diluídos em 100mL de água destilada (Fontes, 2016).

A quantidade de glutathiona reduzida (GSH) foi medida por absorbância, por meio da quantificação dos grupos sulfidrilas presentes na amostra de acordo com o método de Sedlak & Lindsay (1968), através de espectrofotometria à 415nm. As amostras tiveram 50µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 50% adicionados ao sobrenadante. Após agitação, as amostras foram centrifugadas à 10.000 g por 10 min e 4°C e então foram pipetados 50µL do sobrenadante em microplaca. Para o branco foram pipetados 50 µL da solução de TCA à 50% em 200µL de PBS em microplaca (duplicata), a curva padrão também foi realizada em duplicata no volume de 50µL. Os resultados foram expressos em nmol glutathiona por mg proteína.

A atividade enzimática da Glutathiona-S-Transferase (GST) foi quantificada por espectrofotometria, seguindo o método descrito por (Keen et al., 1976) adaptado por Medeiros (2000). Foram utilizados 2mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato artificial e 2mM de GSH em meio contendo tampão Fosfato de Potássio 0,1M, pH 7,0. O produto formado pela reação, S-2,4-dinitrofenilglutathiona, será quantificado pelo aumento de absorbância a 340nm a 30° C, durante dois minutos. O coeficiente de extinção molar (ϵ) de 9,6mM/cm foi expresso como µmol de produto formado/min./mg proteína.

Para realização dessas análises, foram utilizados 2mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1mM de GSH como substrato. O S-2,4-dinitrofenilglutathiona formado pela reação foi quantificado pelo aumento da absorbância a 340nm a 30°C a cada 30 segundos durante 3 minutos em microplaca transparente, sendo os resultados expressos em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína total. A solução tampão foi preparada pela junção de duas soluções prévias: as soluções de pH básico, a partir da diluição de 6,9672g de K₂HPO₄ em 400mL de água Mili-Q e a solução de pH ácido, a partir de KH₂PO₄ diluídos em 400mL de água Mili-Q. A solução do meio de reação pH 6,5, tendo sido feita pela mistura inicial de 0,02g de CDNB em 500µL de etanol, então a solução resultante foi adicionada à outra composta por 0,24 g de Hepes (10mM), 0,03g GSH (1mM) e 0,73g de NaCl (125mM) diluídos em 100mL de água destilada (Fontes, 2016).

A atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx) foi medida por espectrofotometria à 340nm à cada 2 minutos por 10 minutos, utilizando 9,7µL de hidroperóxido de cumeno 1mM incubada em temperatura de 30 °C como substrato (McFarland et al., 1999) e 20µL

de tampão de homogeneização para o branco. A solução tampão foi formada pela mistura de duas soluções (ácida na básica) com o pH ajustado para 7,0. Para a solução ácida foram diluídas em 500mL de água Milli-q: 3,405g de KH_2PO_4 (50mM), 0,0186g de EDTA (0,1mM) e 0,00488g de azida sódica (0,15mM), já a solução básica foi composta por 8,71g de K_2HPO_4 (50mM), 0,0372g de EDTA (0,1 mM) e 0,00975g de azida sódica (0,15mM) em 500mL de água Milli-q. A solução diária, cujo prazo de validade é de apenas 4h, foi feita em tubo falcon de 50mL formada por 0,0461g de glutatona reduzida e 0,146g de NADPH, agitada e por fim incubada à 30 °C.

A atividade de acetilcolinesterase (AChE) foi quantificada pelo método de Ellman et al. (1961), o qual consiste em detectar o 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formando pela reação entre tiocolina (que é um produto da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase) e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). Primeiramente foi preparada uma solução básica de 6,9672g de K_2HPO_4 diluídos em 400mL de água Mili-Q®, e uma solução ácida de 5,4436g de KH_2PO_4 diluídos em 400mL de água Mili-Q®. A solução ácida foi gradativamente colocada na solução básica até o pH 7,5 e refrigerada. Depois, foi preparada a solução de 0,0042g DTNB (0,75mM) diluídos em 500μL de metanol. Em seguida foi preparada solução de 0,0161g de iodeto de acetilcolina (9mM) diluídos em 6mL da solução tampão de fosfato de potássio.

Em uma microplaca de 96 poços transparente, foram pipetados 30μl do sobrenadante da amostra, em duplicata, seguidos de 20μl da solução de DTNB 0,75mM diluída em 13,5ml da solução tampão fosfato de potássio 0,1M e, por último, foram pipetados 50μl de solução de iodeto de acetilcolina 0,9mM. A reação foi lida a 405nm e para o cálculo do Δ -absorbância por minuto, o aumento gradual da absorbância foi quantificado em intervalos de 50 s, durante 5 minutos. O coeficiente de extinção molar (ϵ) da 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina foi considerado $13.6 \times 10^3 \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmoles de acetilcolina hidrolisada.min.mg⁻¹ de proteína, e normalizados com as concentrações de proteínas totais.

A homogeneização das amostras para leitura das quantidades de metalotioneínas ocorreu na proporção 1:5 (w/v) com uma solução tampão Trizma-base 50mM; Sacarose 0,5 M; PMSF 30mM, e pH 8,6. Em seguida, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas por 30 minutos, a 4°C, a 15.000rpm. O sobrenadante foi separado em novos microtubos, e acondicionados a -80°C. A curva padrão de GSH foi preparada a partir da dissolução de 0,0020g de GSH ($\text{MM} = 307,32 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) em 2ml de solução EDTA-NaCl ([GSH] = 1000 μg.ml⁻¹). A solução de EDTA-NaCl (50ml), por sua vez, foi preparada a

partir da dissolução de 0,037g de EDTA dissódico e 0,3652g de NaCl em 40ml de água deionizada, onde foram adicionados 2,45ml de HCl concentrado. Essa solução foi ajustada para 50ml com água deionizada. Assim que a solução de GSH ficou pronta, foram preparadas as concentrações de 0, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de GSH em 6 microtubos distintos e lidas juntamente com as amostras.

A concentração de MT foi quantificada pelo método de Viarengo et al. (1997), utilizando uma fração parcialmente purificada de metalotioneína, a qual foi obtida através de sucessivas etapas. Em um microtubo, 250 μl do sobrenadante foram separados para a adição da solução de etanol e clorofórmio e centrifugado por 10 minutos, a 4°C, a 6.000 rpm. Foram separados 490 μl deste sobrenadante em um novo microtubo e adicionados 1.502 μl da solução de etanol e HCl, e em seguida mantidos a -20°C por 60 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 4°C, a 6.000 rpm. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensão com 1ml de etanol, clorofórmio, tampão Tris-HCL, e posteriormente centrifugado por 10 minutos, a 4°C, a 6.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensão com 50 μl da solução de NaCl. Em seguida, foram adicionados 50 μl da solução de EDTA e HCl e 1ml da solução de NaCl, DTNB, tampão Na-fosfato (reação de Ellman), sendo essa mistura centrifugada por 5 minutos, a 4°C, a 3.000 rpm. Por fim, 200 μl do sobrenadante da reação foram pipetados em microplaca (96 poços), em réplicas, para leitura a 412nm em espectrofotômetro. Com os valores de absorbância foram quantificados os conteúdos de resíduos de SH, uma vez que as metalotioneínas são caracterizadas por um alto conteúdo de cisteínas (30%). Os resultados foram expressos em μg de MTmg⁻¹ de proteína. As concentrações foram estimadas com a curva de GSH como padrão.

Para a realização da análise de peroxidação lipídica (LPO) foi utilizado o protocolo de Wills (1987). Para isso foram preparadas seis soluções, identificadas com números de I a V. A solução I, de HCl (0,1M), foi preparada com 3,64ml de HCl diluídos em 996,36 mL de água Mili-Q®. Em seguida, a solução II, de tetrametoxipropano (TMP), foi preparada a partir da diluição de 10 μL de TMP em 9,99ml da solução I. Depois, para a preparação da solução III, foram diluídos 0,279g de FeSO₄ em 1L de água Mili-Q®, enquanto a solução IV foi preparada com a diluição de 250mg de tricloroacético em 225mL da solução III. Finalmente, para a preparação da solução V, foram diluídos 1,675g de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 250mL de água Mili-Q®. A curva de calibração foi preparada a partir das soluções de TMP, TCA e TBA, em microtubos, dessa forma, foram incubadas em banho maria (70°C) a curva e as amostras incubadas, durante 20 minutos.

Cada microtubo continha 150µL de amostras, 300µL da solução de TCA e 150µL da solução de TBA. A leitura foi realizada por fluorescência a 530nm de excitação e 590nm de emissão e os resultados foram expressos em µg TBARS.mg proteína total⁻¹.

A análise dos danos em DNA seguiu o protocolo proposto por Olive (1998). Primeiramente foi preparada uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) a 2%, com 5g de DSS, EDTA (10mM), Trizma base (10mM) e NaOH (40mM) diluídos em 250mL de água Mili-Q®, a qual foi incubada em temperatura ambiente. Depois, foram preparadas as soluções de 0,22368 g de KCl diluídos em 250mL de água Mili-Q®. Em seguida, foi feita a solução estoque Hoescht, de Trihidrocloreto Trihidratado 10mg.L⁻¹ diluídos em 900µL metanol. Depois, a solução tampão foi preparada a partir de NaCl (0,4M), colato de sódio (4mM) e Trizma-acetato (1mM) diluídos em 50mL de água Mili-Q® (pH de 8,5). A solução final foi preparada com 10 µL da solução estoque de Hoescht diluídos em 9,990mL da solução tampão.

Para a curva de calibração, foi utilizado DNA de esperma de salmão. Primeiramente, foi elaborada a solução tampão com Trizma base-HCl (10mM) e EDTA (1mM) diluídos em 100mL de água Mili-Q® (pH=8,0). Depois, 0,010g de DNA de esperma de salmão foram diluídos em 10mL da solução tampão. Assim, foram pipetadas numa placa preta as soluções de DNA de esperma de salmão, de tampão de homogeneização e da solução de Hoescht. Cada um dos microtubos continha 25µL de amostra, e em seguida recebeu 200µL de SDS a 2%, e agitados por inversão. Após 1 minuto, cada microtubo recebeu 200µL da solução de KCl e novamente agitado. Depois, os microtubos foram colocados em banho-maria a 60°C durante 10 minutos e agitados por inversão novamente. Finalmente, os microtubos foram incubados por 30 minutos a 4°C e em seguida, centrifugados a 8000 g por 5 minutos a 4°C. Foram pipetados 50µL do sobrenadante deste processo em microplacas, em duplicata, e adicionados 150µL da solução de Hoescht em cada poço. As placas já prontas foram submetidas a agitação, por 5 minutos a 700 rpm. em aparelho onde a leitura foi realizada a 360nm de excitação e 450nm de emissão. Os resultados foram expressos em µg DNA.mg proteína total⁻¹.

Análises estatísticas

Os dados foram verificados quanto a normalidade e homoscedasticidade, pelos testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respectivamente. Em seguida, a fim de comparar os resultados das amostras com o controle, para os dados normais e homocedásticos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) de uma via e para os dados heterocedásticos foi

realizada Kruskal-Wallis, e para ambos o teste a posteriori de Dunnett. Para integração dos dados, foram realizadas análises fatoriais com extração dos dados por meio de análise de componentes principais (FA/PCA) considerando cada campanha de amostragem separadamente, e usando matrizes contendo os dados de metais nos sedimentos e biomarcadores em *C. fluminea* para analisar se existe relação entre os elementos medidos e os efeitos bioquímicos nos organismos expostos. O fator de corte usado para atribuir relevância às correlações das variáveis aos respectivos fatores foi de 0,05.

Resultados

Análise química de sedimentos

Os resultados das análises químicas de sedimentos estão apresentados no capítulo 1 (Tabelas S16, S17, S18 e S19). De modo geral, as concentrações estiveram abaixo dos níveis de efeito provável para os organismos (CONAMA 454 – nível II) e que os sedimentos do Alto Rio Doce apresentaram níveis acima dos níveis aceitáveis para As. As concentrações de Fe e Al estiveram permanentemente altas, em todas as campanhas. A fração granulométrica dos sedimentos coletados um mês após o desastre apresentaram predominantemente fração de silte e argila (capítulo 1), com maior predominância de areia nos sedimentos coletados nos anos seguintes, com maior heterogeneidade dos tamanhos dos grãos na coleta realizada um ano após o rompimento da barragem. Da mesma forma, o teor de matéria orgânica foi maior nos sedimentos coletados logo após o rompimento, com maior heterogeneidade dos dados, quando comparados com os sedimentos coletados após esse período, com maior homogeneidade para os sedimentos coletados em 2019.

Análises químicas nos tecidos de *C. fluminea*

Conforme os resultados demonstrados no Capítulo 2, os organismos expostos aos sedimentos coletados ao longo da bacia do rio Doce apresentaram fatores de bioacumulação (BAF) relativamente baixos (Cruz et al., 2021), mesmo que alguns metais tenham sido detectados em seus tecidos. Os organismos expostos em sedimentos coletados em 2015 (M2 e J10), apresentaram maior acumulação de Fe em seus tecidos, com níveis mais altos de Mn nos organismos expostos em M2. Porém, os valores de BAF foram significativos (>1) para o Zn, também nos organismos expostos em M2. Os organismos expostos em sedimentos coletados um ano após o desastre, de um modo geral,

apresentaram níveis mais baixos de bioacumulação, porém com $BAF > 1$ para o Cr em organismos expostos em sedimentos coletados em Manhuaçu (ponto controle); Cu nos organismos expostos para a maioria das amostras; Pb em organismos expostos em J4; e novamente Zn nos organismos expostos em M2, assim como nos organismos expostos em sedimentos coletados em J2, J4, J5, J13 e Manhuaçu.

Os níveis de bioacumulação nos organismos expostos em sedimentos coletados em 2019 (estação chuvosa) foram em sua maioria baixos, com $BAF > 1$ para Cu e Zn, apenas para os organismos expostos em J15, muito semelhante aos dados de bioacumulação dos organismos expostos em sedimentos coletados no mesmo ano em estação seca, com $BAF > 1$ para Cu e Zn, em organismos expostos em J16.

Análise de biomarcadores

No experimento referente aos sedimentos da 1ª campanha, os parâmetros físico-químicos da água nas câmaras-teste estão indicados como anexo ao final do capítulo. Nesse experimento, não foi observada diferença significativa com relação ao controle para nenhum dos biomarcadores analisados (figura 1).

Nos experimentos com sedimentos da 3ª campanha, não foram observados efeitos para a maioria das amostras testadas, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle apenas para as atividades de GSH em J4 ($p = 0,024$) e J5 ($p = 0,006$), GST em C2 ($p = 0,023$) e LPO em C1, C2 e J13 (figura 2).

Não foi possível analisar dados de metalotioneína dos organismos expostos às amostras da 1ª e 3ª campanhas devido à disponibilidade de tecidos.

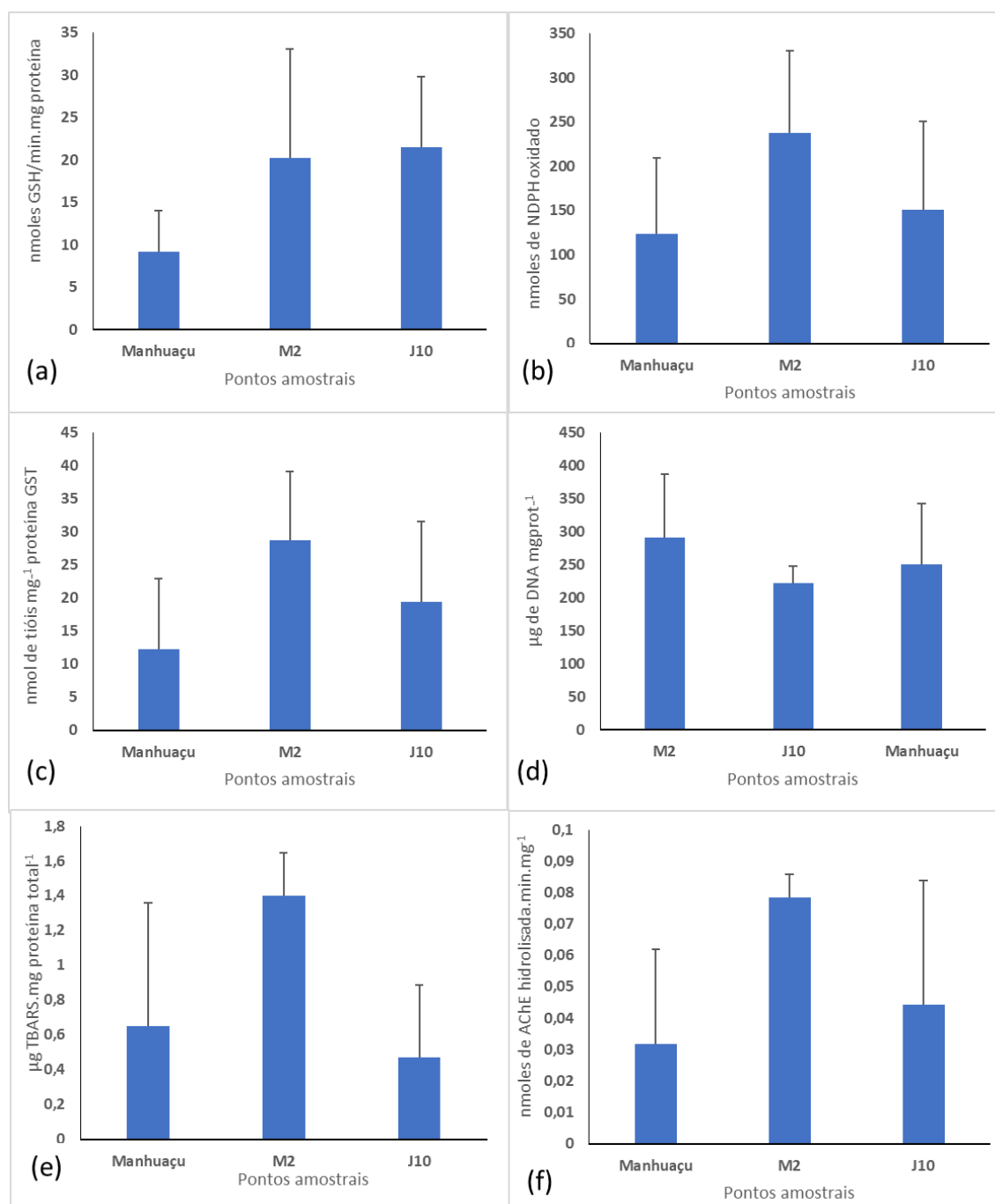


Figura 1 - (a) quantidade de GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos aos sedimentos da 1ª campanha.

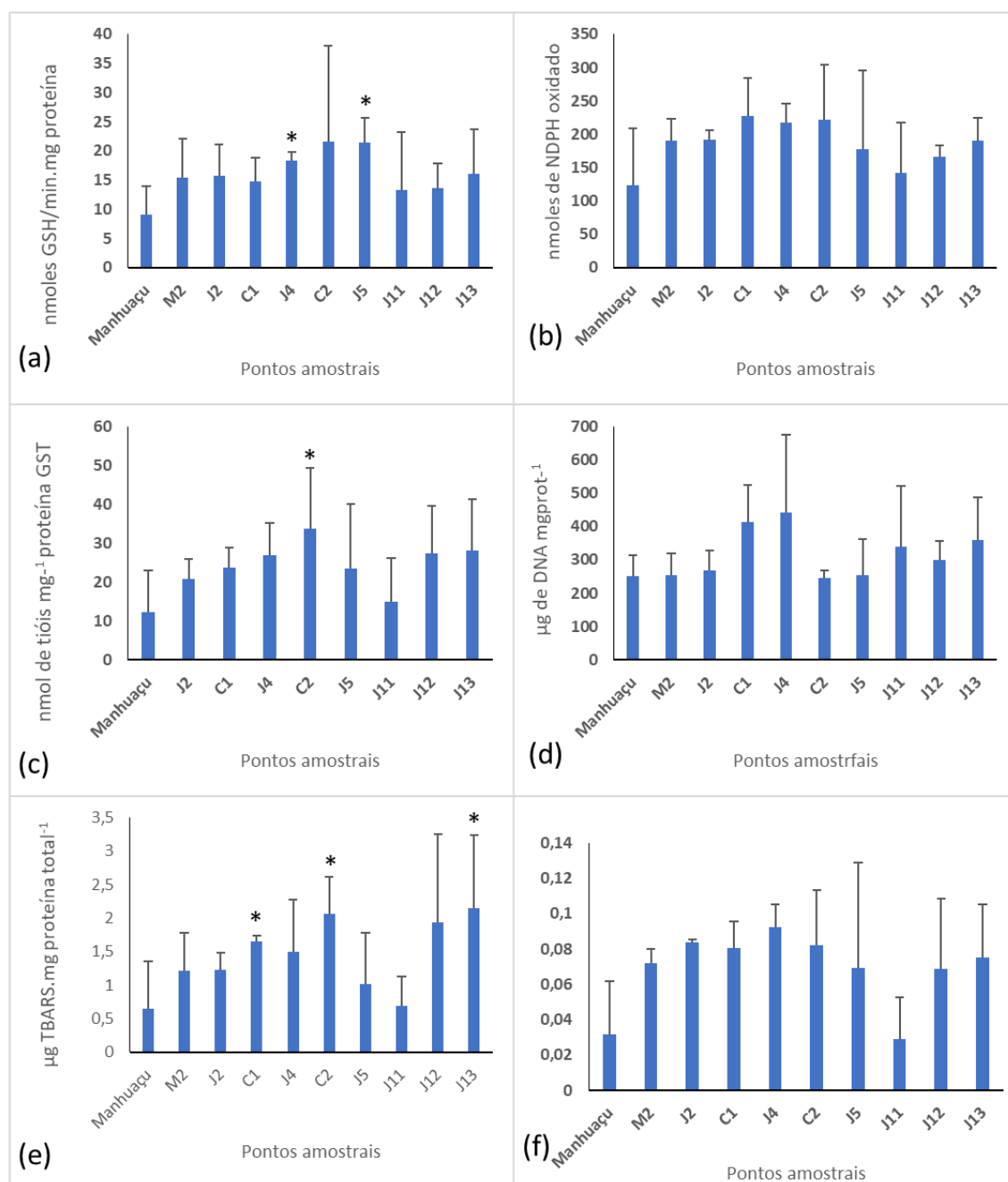


Figura 2 - (a) quantidade de GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE, em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos da 3ª campanha. Asteriscos indicam diferença com relação ao controle.

Não foram observadas diferenças significativas com relação ao controle para a maioria dos biomarcadores medidos nos organismos expostos aos sedimentos da quarta campanha (figura 3), onde apenas os organismos expostos em J14 apresentaram níveis significativamente mais elevados de GPx ($p=0,017$) e organismos expostos em J15 apresentaram níveis significativamente mais reduzidos de GST ($p=0,012$). Em relação à quantidade de glutathiona reduzida, embora nominalmente, os organismos de J4 tenham

apresentado valor médio um pouco mais elevado, estes não foram estatisticamente diferentes do controle. Os valores de metalotioneína dos pontos J4, J12 e J15 apresentaram-se negativos, sugerindo que a proteína não foi calculada e, portanto, os dados não foram inseridos nas estatísticas.

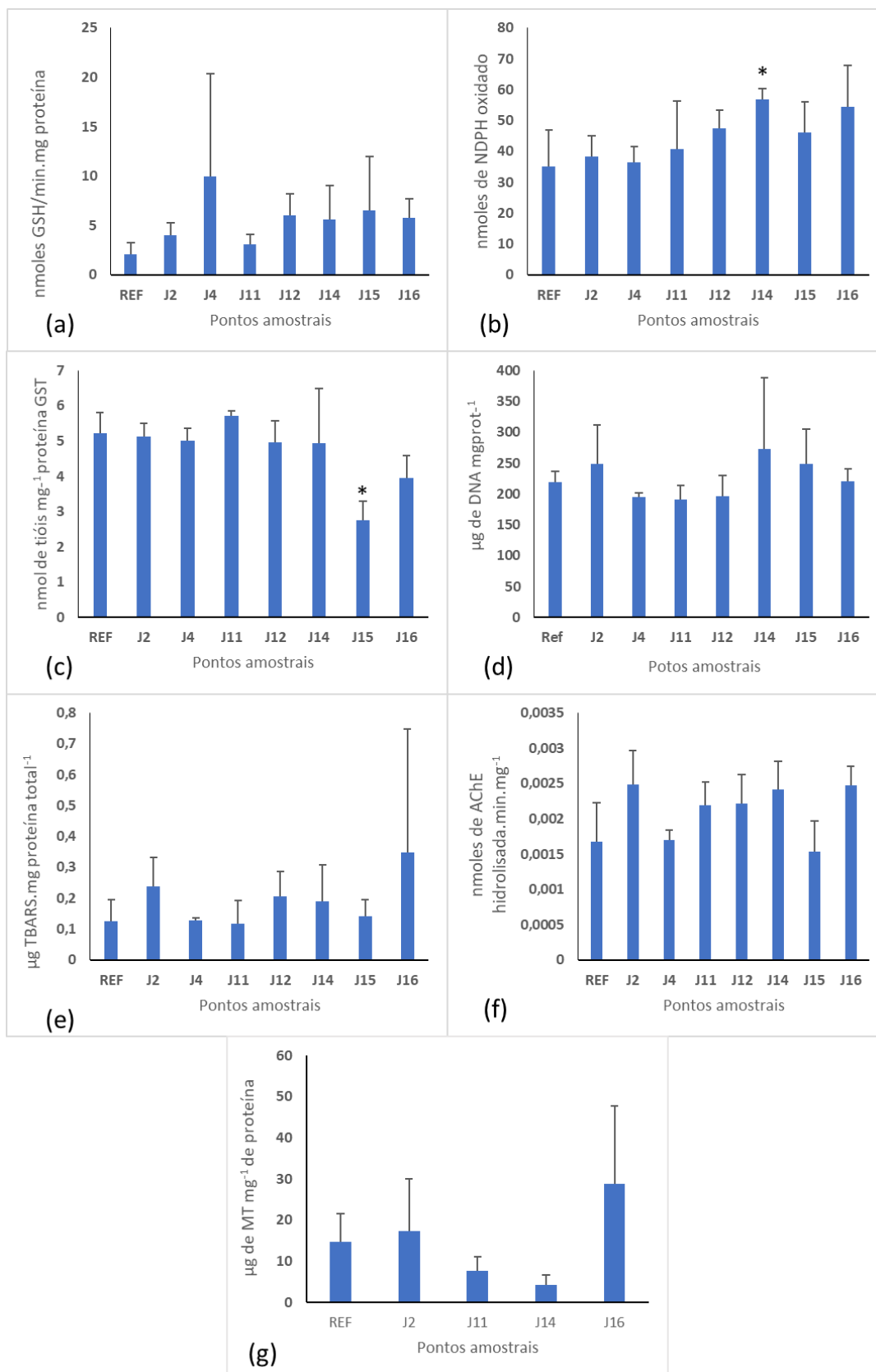


Figura 3 – (a) quantidade de GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE e (g) quantidade de metalotioneína, em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos da 4ª campanha. Asteriscos indicam diferença com relação ao controle.

Em relação às respostas bioquímicas das exposições aos sedimentos da 5ª campanha (figura 4), foram observadas diferenças significativas com relação ao controle apenas para as atividades de acetilcolinesterase em J4, J11 e J14, onde foram observadas redução da atividade quando comparadas com REF. Nas análises de metalotioneína, apesar da ausência de diferença significativa, os animais expostos ao sedimento de J15 apresentaram quantidades cerca de 3 vezes maiores que os medidos nos animais expostos ao sedimento referência.

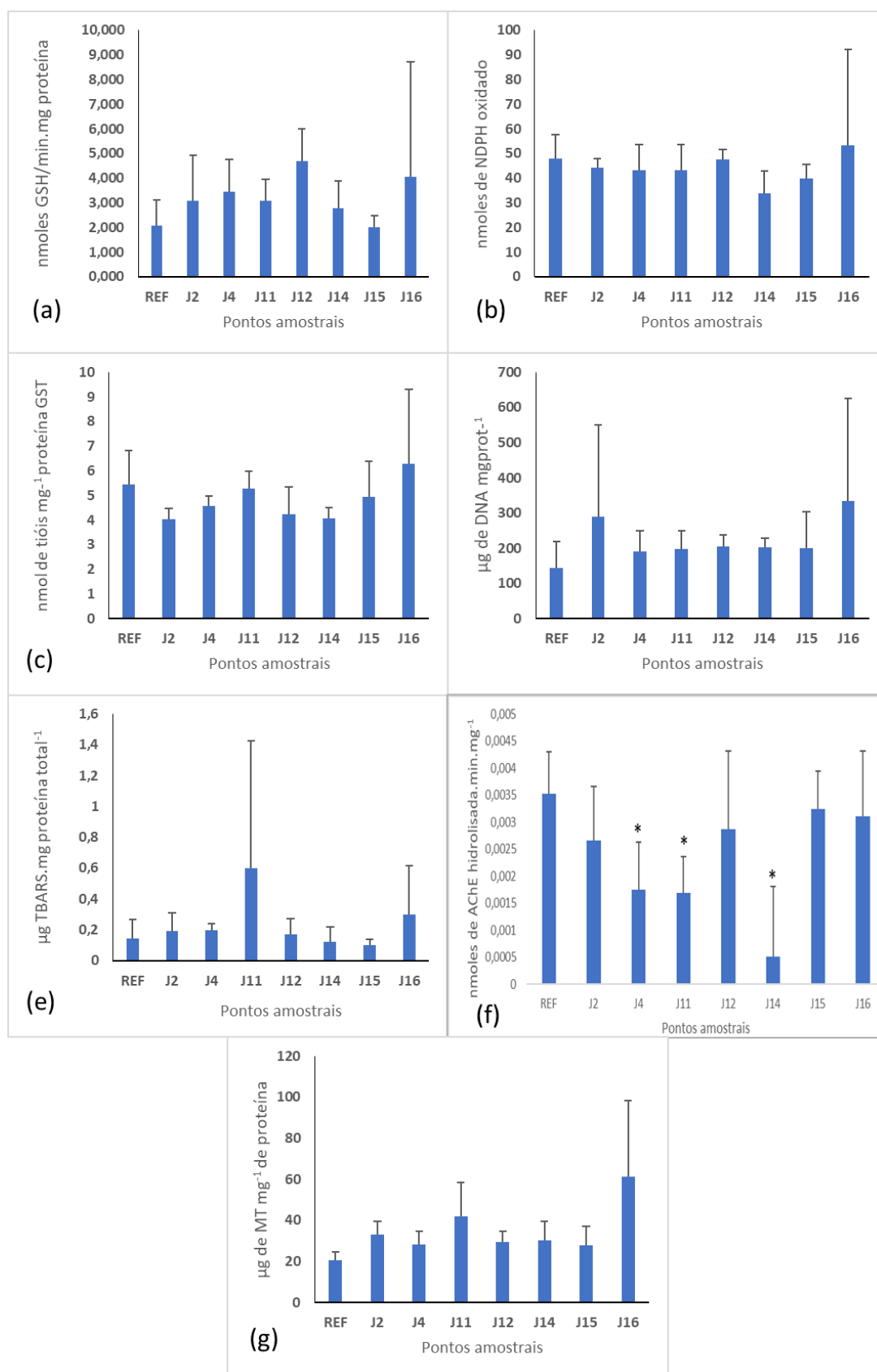


Figura 4 - quantidade de GSH; (b) atividade de GPx; (c) atividade de GST; (d) danos em DNA; (e) LPO; (f) atividade de AChE e (g) quantidade de metalotioneína, em tecidos de *Corbicula fluminea* expostos em sedimentos da 5ª campanha. Asteriscos indicam diferença com relação ao controle.

Análise de Componentes Principais (FA/PCA)

Para a análise FA/PCA realizada a partir dos resultados dos biomarcadores e ocorrência de metais em sedimentos da 3ª campanha, extraiu-se três fatores dos dados originais que explicaram 84,96% das variâncias. O fator 1 explicou 38,96% das variâncias associadas aos metais As, Cd, Mn e Fe nos pontos M2 e J11 da terceira campanha. Esses metais não apresentaram relação com as respostas dos biomarcadores analisados, ou seja, os metais apresentaram concentrações aumentadas relacionadas com as fontes de mineração, porém não causaram danos aos organismos, considerando-se os biomarcadores medidos. O Fator 2 explicou 25,97% das variâncias e não relaciona os metais com os biomarcadores. Esse Fator apresentou correlações positivas entre os biomarcadores analisados, com exceção de danos em DNA, possivelmente relacionados aos pontos M2, J4, J13, C1 e C2. Já o Fator 3 explicou 20,02% das variâncias, e apresentou correlações positivas entre alguns metais medidos (Cr, Ni, Pb, Zn e Al).

Tabela 1 – Associações (loadings FA/PCA) sobre concentração de metais e respostas de biomarcadores após exposição de *Corbicula fluminea* em sedimentos coletados em 2016.

	F1	F2	F3
Eigenvalue	6,235	4,156	3,20
% Total	38,97	25,97	20,02
Cumulative (%)	38,97	64,94	84,97
Element	Factor 1	Factor 2	Factor 3
As	0,977	-0,033	0,146
Cd	0,990	-0,043	0,070
Cr	0,018	0,195	0,969
Cu	0,843	-0,025	0,452
Mn	0,976	0,090	-0,087
Ni	0,356	0,194	0,893
Pb	0,344	-0,275	0,874
Zn	-0,007	0,203	0,936
Fe	0,881	-0,069	0,319
Al	0,052	-0,424	0,845
GSH	-0,026	0,773	0,037
GST	0,219	0,889	0,166
GPx	-0,037	0,962	0,004
DNA	-0,332	0,263	0,022
LPO	-0,275	0,761	0,109
AChE	-0,049	0,909	-0,292

Tabela S1 – Scores estimados para cada ponto de coleta da 3ª campanha

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
M2	2,763	0,281	-0,280
J2	-0,165	-0,018	-0,772
J4	-0,479	0,777	-0,831
J5	-0,035	0,006	-0,789
J11	0,204	-1,403	1,911
J12	-0,412	-0,382	0,450
J13	-0,565	0,515	-0,564
C1	-0,443	0,719	0,401
C2	-0,398	1,380	1,370
Manhuaçu	-0,470	-1,875	-0,895

Para a 4ª campanha, foram 4 Fatores, com 88,33% das variâncias explicadas pelos dados originais. O Fator 1 explicou 38,40% das variâncias, onde As, Cd, Cu, Mn, Ni, Fe apresentaram correlação positiva, e GPx apresentou correlação negativa, indicando uma associação inversa houve associação entre esses metais e a atividade de GPx. Em relação ao Fator 2, Cd, Pb, Zn, Fe e Al tiveram correlação positiva, enquanto GSH teve correlação negativa, também indicando uma associação entre estas variáveis. Fator 3 associou as respostas de GPx, AChE, LPO e MET. O Fator 4 houve correlações positivas para o Cr e a atividade da GST.

Tabela 2 - Associações (loadings FA/PCA) sobre concentração de metais e respostas de biomarcadores após exposição de *Corbicula fluminea* em sedimentos coletados em período chuvoso de 2019.

	F1	F2	F3	F4
Eigenvalue	6,529	4,45	2,121	1,916
% Total	38,409	26,178	12,474	11,272
Cumulative (%)	38,409	64,587	77,061	88,333
Element	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
As	0,973	-0,168	-0,129	0,006
Cd	0,855	0,509	0,067	0,035
Cr	-0,127	0,239	0,303	0,899
Cu	0,951	0,208	-0,132	0,027
Mn	0,947	-0,132	-0,241	-0,049
Ni	0,904	-0,144	-0,149	0,354
Pb	0,178	0,965	0,103	0,078
Zn	-0,016	0,983	0,094	0,149
Fe	0,771	0,575	0,173	0,168
Al	-0,132	0,969	0,133	0,04
GSH	-0,274	-0,598	0,233	-0,472
GST	0,372	0,198	0,162	0,795
GPx	-0,599	-0,299	-0,682	0,05
DNA	0,113	0,038	-0,457	-0,269
LPO	0,022	-0,202	-0,915	-0,172
ACHe	0,216	-0,300	-0,775	0,498
Met	0,309	0,236	-0,572	-0,246

Tabela S2 - Scores estimados para cada ponto de coleta da 4ª campanha

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
J2	2,316	-0,394	-0,633	-0,164
J4	0,087	-0,630	1,346	-0,641
J11	-0,034	-0,440	0,744	1,792
J12	-0,557	-0,340	0,042	0,440
J14	-0,704	-0,080	-0,723	0,711
J15	-0,592	-0,438	0,617	-1,544
J16	-0,670	-0,114	-1,782	-0,509
REF	0,153	2,435	0,390	-0,085

Os dados de exposição nos sedimentos coletados em 2019, durante a estação seca, foram explicados por 88,79% das variâncias. O Fator 1 demonstra correlações positivas entre GSH, danos em DNA, peroxidação lipídica e Metalotioneínas. Essa relação está associada aos pontos J4, J11, J12 e J16. O Fator 2 demonstra correlações positivas para

As, Cd, Mn e Fe, associadas principalmente ao ponto J2. O Fator 3 demonstra associação entre o Pb e as atividades da GST, GPx e AChE, estando associado aos pontos J2, J12, J16 e REF. Por fim, o Fator 4 relaciona Cr, Cu, Ni, Pb Zn e Al entre si, porém não entre os biomarcadores analisados.

Tabela 3 - Associações (loadings FA/PCA) sobre concentração de metais e respostas de biomarcadores após exposição de *Corbicula fluminea* em sedimentos coletados em período chuvoso de 2019.

	F1	F2	F3	F4
Eigenvalue	5,395	4,468	2,900	2,333
% Total	31,737	26,281	17,056	13,724
Cumulative (%)	31,737	58,018	75,074	88,798
Element	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
As	0,186	0,944	-0,145	0,06
Cd	-0,024	0,981	0,092	0,098
Cr	0,295	-0,154	0,024	0,859
Cu	0,054	0,299	-0,004	0,906
Mn	-0,052	0,976	-0,001	-0,176
Ni	0,361	0,123	-0,226	0,828
Pb	-0,498	0,115	0,54	0,598
Zn	-0,292	0,011	0,391	0,856
Fe	-0,081	0,978	0,083	0,027
Al	-0,464	-0,373	0,370	0,706
GSH	0,777	0,068	0,059	0,101
GST	0,259	-0,490	0,674	-0,296
GPx	0,437	0,052	0,865	-0,002
DNA	0,501	0,322	0,203	-0,731
LPO	0,701	-0,054	0,028	0,065
AChE	-0,125	0,109	0,906	0,117
Met	0,727	-0,152	0,231	-0,616

Tabela S3 - Scores estimados para cada ponto de coleta da 4ª campanha

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
J2	-0,195	2,367	0,019	-0,620
J4	0,445	0,093	-0,872	0,540
J11	1,156	-0,253	-0,324	0,607
J12	0,648	0,005	0,281	1,456
J14	-0,834	-0,689	-1,658	-0,873
J15	-0,838	-0,554	-0,008	0,013
J16	1,139	-0,677	1,162	-1,666
REF	-1,521	-0,291	1,399	0,543

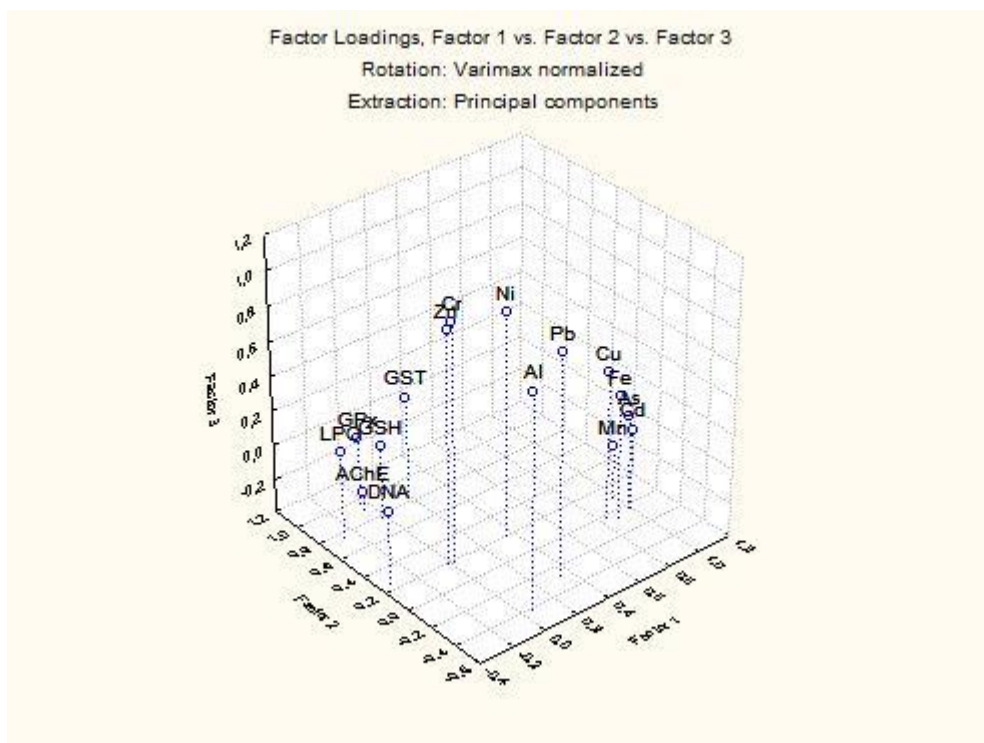


Figura 5 - Distribuição tridimensional dos loadings da FA/PCA baseada nos dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* e metais em sedimentos de 2016.

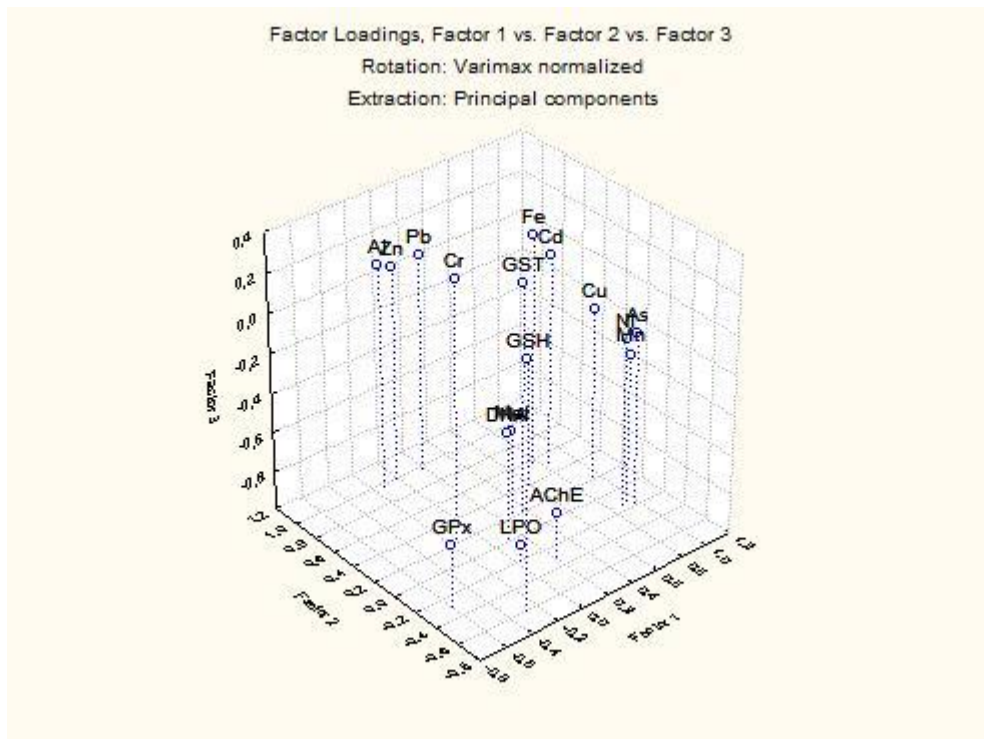


Figura 6 - Distribuição tridimensional dos loadings da FA/PCA baseada nos dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* e metais em sedimentos de 2019 (estação úmida).

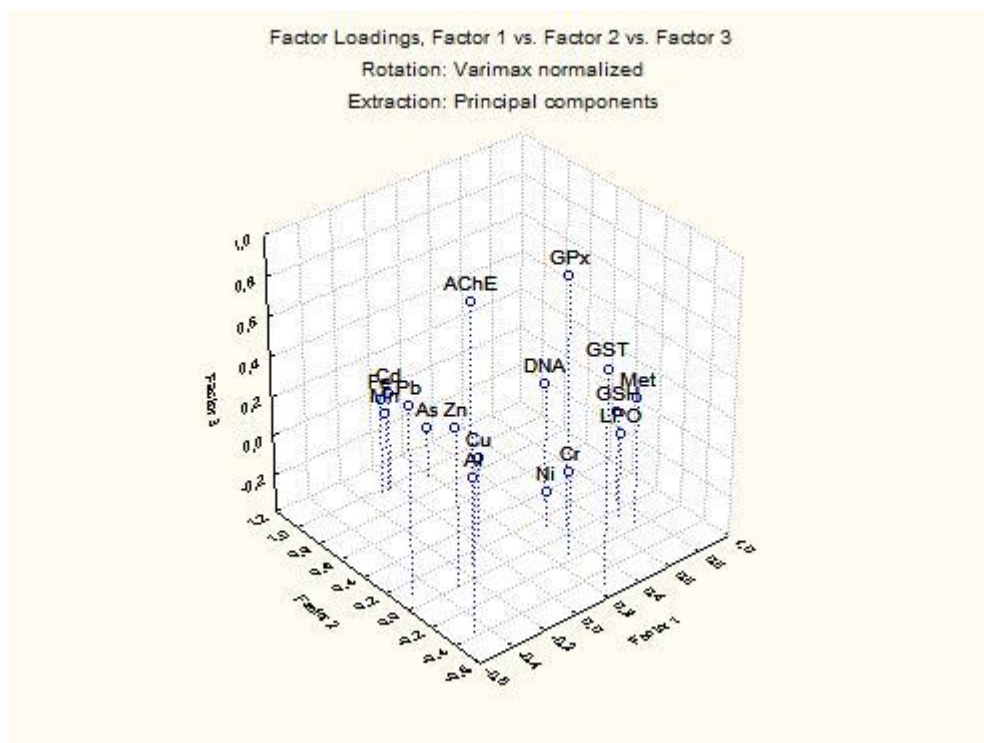


Figura 7 - Distribuição tridimensional dos loadings da FA/PCA baseada nos dados de biomarcadores em *Corbicula fluminea* e metais em sedimentos de 2019 (estação seca).

IBR - Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)

A resposta integrada de biomarcadores (IBR) foi calculada para reunir e sintetizar as respostas dos biomarcadores, permitindo uma interpretação abrangente (Beliaeff & Burgeot, 2001).

Na 1ª campanha (figura 8), apenas duas amostras puderam ser testadas. Mesmo sem diferenças significativas entre os biomarcadores, os organismos expostos à amostra M2 (ponto à montante da barragem) apresentaram maiores alterações para os biomarcadores analisados do que os organismos expostos em J10 (Rio Doce na cidade de Ipatinga) quando os dados são comparados com os animais expostos ao sedimento referência Manhauçu.

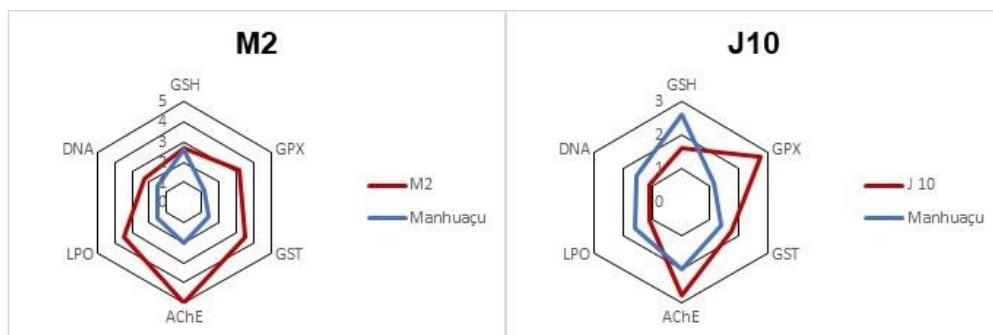


Figura 8 – Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 1ª campanha (2015).

Com relação as amostras da 3ª campanha, apenas os animais expostos ao sedimento de J11 (Naque) apresentaram menor atividade de AChE com relação aos valores de Manhuaçu. Quando os valores de IBR (figura 9, tabela S4) de cada ponto de coleta foram comparados entre si, foi observado que o ponto C1 apresentou as piores condições para a saúde dos organismos. Esse ponto é localizado no Rio Piranga, local afastado das influências do rejeito. Esse dado reforça a importância dos estudos dos pontos de coleta de rios tributários para estudo de impacto ambiental na BDR, para compreensão da influência de outras fontes poluidoras que não eram foco deste estudo.

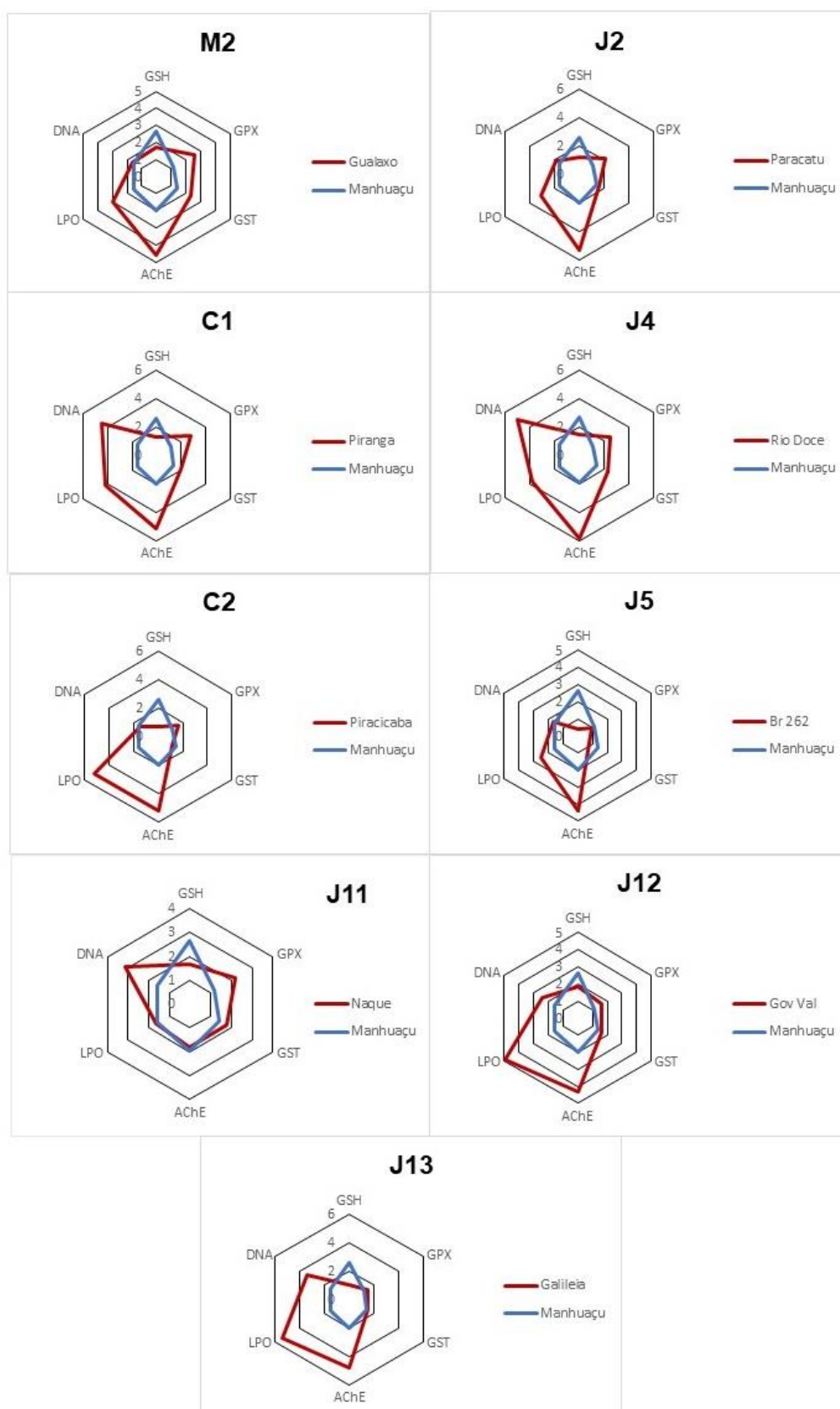


Figura 9 - Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 3ª campanha (2016).

Tabela S4 - Classificação das condições dos pontos da 3ª coleta quanto ao IBR (piores condições possuem IBR maiores).

Amostra	IBR
C1	3,09
J11	2,40
J13	2,17
M2	2,11
J2	2,03
J4	2,01
Manhuaçu	1,72
C2	1,69
J5	1,68
J12	1,16

Na 4ª campanha (figura 10), foi observado que na maioria dos pontos as condições foram similares ao ponto REF (Rio Corrente), com maiores diferenças observadas no ponto J16 (Rio Doce em Linhares). Os valores de IBR indicaram que J16 apresentou as piores condições para os organismos enquanto J15 (Rio Doce em Colatina) foi o ponto onde os organismos se encontraram mais saudáveis.

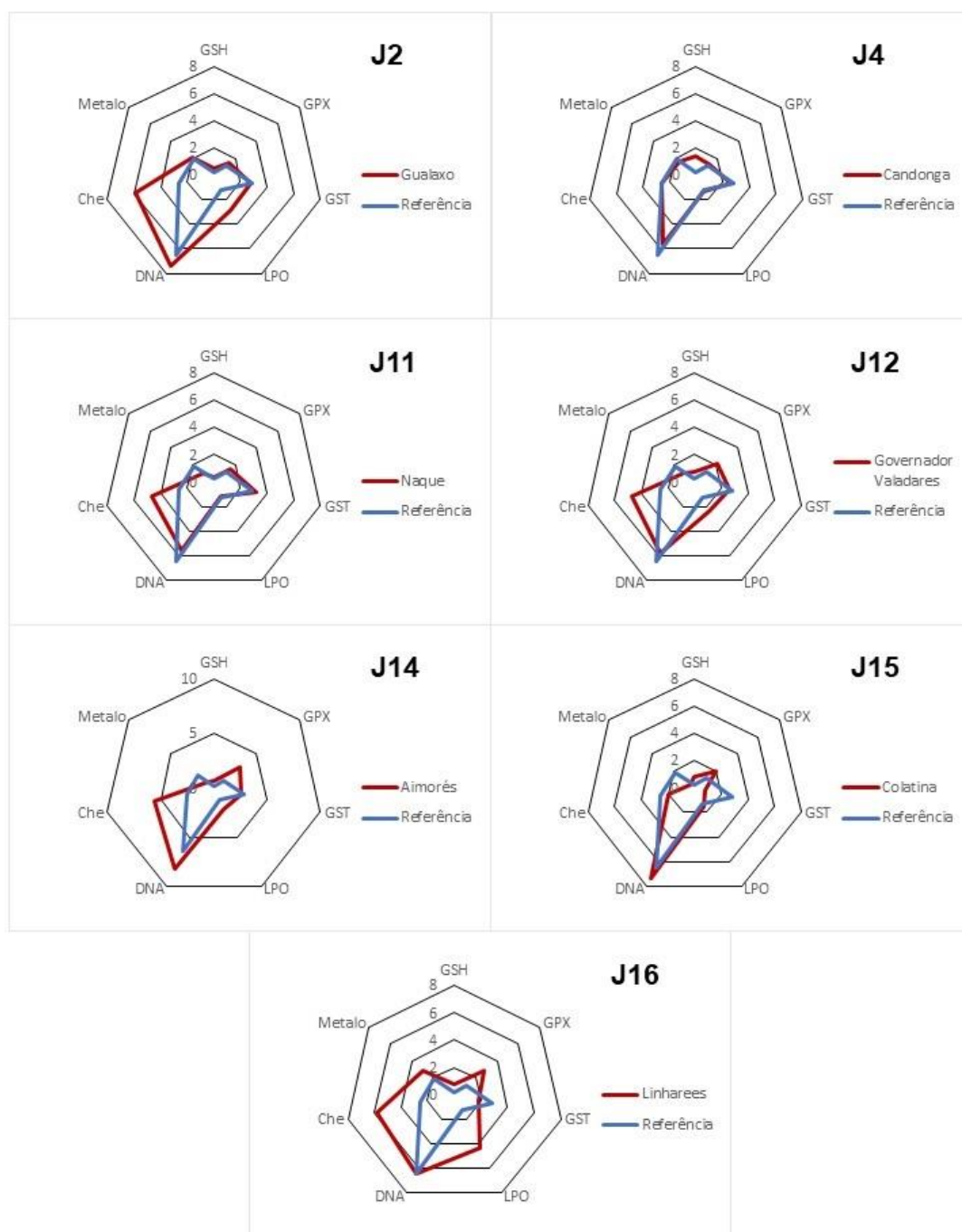


Figura 10 - Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 4ª campanha (2019 – estação chuvosa).

Tabela S5 - Classificação das condições dos pontos da 4th coleta quanto ao IBR (piores condições possuem IBR maiores).

Amostra	IBR
J16	2,48
J14	2,30
J2	2,27
J12	1,95
J11	1,75
J4	1,63
Referência	1,63
J15	1,49

Na 5^a campanha (figura 11, Tabela S6) é possível observar que o ponto de coleta J11, apresentou as piores condições conforme IBR, em contraste com o ponto de coleta J14 (Rio Doce em Aimorés), que apresentou melhores condições para os organismos analisados.

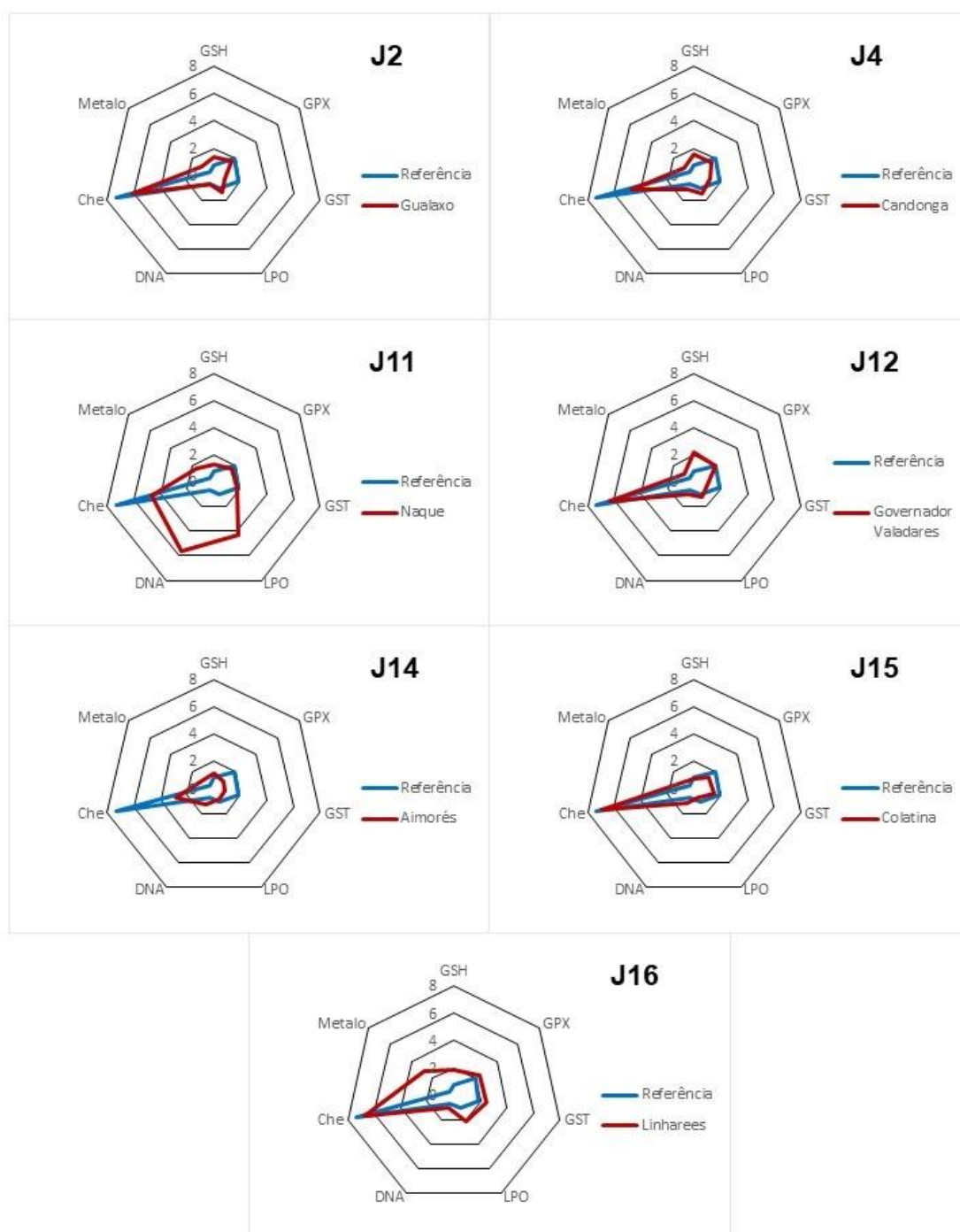


Figura 11 - Gráfico radar das respostas dos biomarcadores em tecidos moles de *C. fluminea* expostos em sedimentos da coleta da 5ª campanha (2019 estação seca).

Tabela S6 - Classificação das condições dos pontos da 5th coleta quanto ao IBR (piores condições possuem IBR maiores).

Amostra	IBR
J11	2,08
J16	1,93
J12	1,46
Referência	1,41
J15	1,33
J2	1,30
J4	1,24
J14	0,88

Discussão

De acordo com estudos anteriores, os sedimentos da bacia do rio Doce apresentam naturalmente altas concentrações de metais, devido à natureza mineral enriquecida do QF (Pires et al., 2003). Além disso, a exploração industrial de minérios na região alterou por décadas os ciclos geoquímicos, e ainda contribui para o aumento da ocorrência de uma série de elementos químicos no ambiente aquático da bacia (Pires et al., 2003; Arantes et al., 2009; Rodrigues et al., 2012; Lacerda et al., 2014). Somam-se a essas alterações os despejos de esgotos domésticos e industriais (Yamamoto et al., 2023), que também contaminam os corpos d'água. Dessa forma, atividades industriais e mineradoras vem acelerando processos que influenciam na presença de contaminantes, impulsionando os aspectos negativos, como perturbação da comunidade aquática (Gomes et al., 2017).

Diante desse quadro, e considerando que uma parcela importante da contaminação da BRD advém de atividades mineradoras, alguns estudos demonstraram altos níveis de metais em sedimentos coletados ao longo da bacia, após o desastre de Mariana (Hatje et al., 2017; Duarte et al., 2021), corroborando com esse trabalho (capítulo 1). Também foi demonstrado neste trabalho que houve redução da contaminação ambiental ao longo do tempo, assim como foi observado por outros autores (Gabriel et al., 2020; Richard et al., 2020). Em contrapartida, é importante estudar os efeitos ecotoxicológicos em resposta à exposição aos sedimentos influenciados pelo rejeito, uma vez que as análises químicas isoladas podem não fornecer dados suficientes sobre o real impacto na fauna (Ferrari et al., 1999; Abessa, 2002).

Nossos resultados demonstram, no geral, ausência de efeitos bioquímicos severos nos organismos expostos aos sedimentos influenciados pelos rejeitos de mineração

liberados após o rompimento da barragem do Fundão, mesmo em sedimentos coletados um mês após o desastre. Além disso, os metais bioacumulados e o baixo valor do fator de bioacumulação (conforme o capítulo 2 deste trabalho) foram importantes para não induzir uma resposta bioquímica significativa nos organismos. No capítulo 2, foram obtidas evidências de que parte dos metais poderia não estar biodisponível, por estar ligada a óxidos de ferro, e que a parcela biodisponível alcançaria concentrações com as quais os bivalves poderiam lidar, por meio de seus mecanismos de depuração.

Os resultados das análises de biomarcadores dos organismos expostos aos sedimentos da primeira campanha, não obtiveram diferença significativa nas respostas dos biomarcadores medidos, quando comparado com o controle. Os organismos expostos a esses mesmos sedimentos (amostras M2 e J10) apresentaram maiores níveis de Fe em seus tecidos moles, como demonstrado no capítulo 2, porém com bioacumulação importante para o Zn ($BAF > 1$), para os que foram expostos somente em M2 (à montante da barragem do Fundão), onde foram observadas altas concentrações de Fe, As e Mn (capítulo 1), não relacionadas com os resíduos liberados pela barragem.

Já os organismos expostos em sedimentos coletados um ano após o rompimento da barragem, apresentaram algumas alterações pontuais com relação aos biomarcadores, porém não relacionados aos metais analisados nos sedimentos. Observou-se peroxidação lipídica nos organismos expostos em C1, C2 e J13, onde foi observado enriquecimento mineral moderado para Cu em C1, Cr e Ni em C2 e Zn em C1, C2 e J13, com concentrações acima dos níveis de toxicidade limiar adotado na legislação brasileira para o Cr em C2. Os organismos expostos ao ponto C1 apresentaram maiores concentrações de Cu, Zn e Fe em seus tecidos com $BAF < 1$ em todas as amostras. Os organismos expostos em C2 e J13 apresentaram altas concentrações de Fe em seus tecidos moles, seguido de Al, Zn, e Cu, com valores de $BAF > 1$ para o Cu nos animais expostos em C2, $BAF > 1$ para Zn e Cu, nos animais expostos nos sedimentos coletados em J13.

De acordo com alguns estudos, *C. fluminea* são capazes de bioacumular Cu e Zn em seus tecidos quando expostos em ambientes poluídos por metais pesados (Guimarães & Sígulo, 2008; Bonnail et al., 2016), sobretudo nas brânquias e glândulas digestivas (Xie et al., 2018). Fe, Cu e Zn são metais essenciais, chamados de micronutrientes, com importantes funções metabólicas nos organismos, porém, assim como sua deficiência pode trazer efeitos negativos, a ocorrência em concentrações supra ótimas pode induzir formação de ROS (Xie et al., 2018; Reeder et al., 2006). Cu e Zn são comumente encontrados em ambientes impactados por efluentes industriais, escoamento agrícola,

e/ou ricos em matéria orgânica pelo lançamento de esgotos domésticos (Villar et al., 1999), e não possuem associação direta com os rejeitos de mineração, o que nos indica a absorção desses elementos a partir dos sedimentos pode advir de outras fontes de poluição.

Em estudos com vertebrados, Gabriel et al. (2020) também observaram maiores concentrações de Zn em hepatócitos de peixes demersais, coletados no estuário do Rio Doce, quase 2 anos após o desastre, porém, diferentemente desse trabalho, os autores encontraram correlação positiva entre as expressões de GSH aumentadas e a concentração de metais em seus tecidos hepáticos, assim como para metalotioneínas. Esses resultados evidenciaram que os peixes estavam com seus sistemas de depuração de metais ativados. Por outro lado, Yamamoto et al. (2022) observaram danos em DNA e aumento da atividade de GST em alevinos de *Rhamdia quelen*, relacionados aos contaminantes inorgânicos presentes em elutriados de sedimentos coletados ao longo do rio Doce, quatro anos após o rompimento da barragem, onde os efeitos genotóxicos foram mais significativos nos organismos expostos aos sedimentos do Alto e Médio Rio Doce, enquanto as maiores alterações na atividade enzimática na defesa contra o estresse oxidativo foram observadas em organismos expostos em sedimentos do baixo RD. Tais resultados corroboram que parcela dos metais pode se tornar disponível, e alguns organismos podem ser afetados. Isso ressalta a necessidade de estudos com múltiplas espécies, visando abranger os impactos sobre nichos ecológicos.

Os animais expostos aos sedimentos de C2, sem influência do rejeito, apresentaram níveis de GST aumentados com peroxidação lipídica. A LPO pode estar relacionada à sobreposição do sistema de depuração pelas forças oxidantes, levando aos danos celulares irreversíveis como danos em membrana (Tesser et al., 2020). Já a glutathione-S-transferase (GST) atua na detoxificação de substâncias orgânicas através da conjugação desses xenobióticos, para que possam ser excretados pelo organismo (Van Der Oost et al., 1996). Assim, os níveis aumentados de GST nos organismos expostos aos sedimentos coletados em C2 pode estar relacionado à ativação desse processo de depuração de compostos tóxicos, onde não há influência do rejeito (Oliveira et al., 2015; Vieira et al., 2018). Indivíduos expostos aos sedimentos de C1 e J13 também apresentaram diferença significativa para LPO. A ocorrência de peroxidação lipídica pode indicar estresse oxidativo nos organismos (Oliveira et al., 2018); o ponto C1 está localizado em regiões onde não houve derramamento dos rejeitos de mineração, porém é um local onde pode haver diferentes fontes de contaminação (Santolin et al., 2015)

enquanto J13 localiza-se em Galileia, próximo da cidade de Governador Valadares, no Médio Rio Doce, onde há diversas atividades antrópicas que causam contaminação aquática, como esgoto doméstico e efluentes industriais, e consequentemente efeitos na biota (Carvalho et al, 2018). Dessa forma, os resultados deste trabalho evidenciam que os rejeitos de mineração não foram responsáveis pelos efeitos bioquímicos observados em *C. fluminea*, e que os animais, no geral, apresentaram alto potencial de depuração, já o sistema de detoxificação frequentemente esteve ativado, como indicado pelos níveis de GSH e Metalotioneínas, e atividade de GST e GPx.

Na quarta campanha, os organismos expostos aos sedimentos não apresentaram efeitos nos biomarcadores. Somente os bivalves expostos aos sedimentos de J14 apresentaram peroxidação lipídica e níveis de GST diminuídos. Esse resultado pode ser explicado pela falha do sistema antioxidante, uma vez que a GST está relacionada à defesa contra compostos tóxicos, atuando através da conjugação do metabólito tóxico à GSH e, portanto, se as concentrações de GST são diminuídas há comprometimento do sistema antioxidante e, consequentemente, indução de danos sobre as estruturas lipídicas das membranas (LPO) (Vieira et al., 2018). Os teores de GSH e atividade da GST associaram inversamente com alguns elementos, indicando indução do sistema de detoxificação. Já os organismos expostos em sedimentos coletados na 5ª campanha, apresentaram diminuição de acetilcolinesterase em J4, J11 e J14. Nesta campanha, os sedimentos de J4 e J11 apresentaram níveis elevados de As, mas não foi observado relação com os efeitos neurotóxicos de acordo com a FA/PCA. A queda da atividade da AChE nesses locais pode ter relação com as atividades produtivas de agricultores ao longo do curso do rio Doce (Silva & Andrade, 2016; Yamamoto et al. 2022). Conforme Eskenasi et al. (1999), pesticidas são altamente tóxicos para o sistema nervoso central de vertebrados, onde atuam reduzindo a atividade da AChE, levando à deformidade de organismos.

Yamamoto et al. (2022) também observaram níveis elevados de HPAs em amostras de sedimentos do rio Doce, influenciados tanto pela descarga de contaminantes industriais, urbanas quanto de atividades agropecuárias, com maiores níveis nos trechos do médio e baixo curso do rio. São poucos os estudos que abordam a contaminação crônica de sedimentos da BRD por compostos orgânicos, apesar de já terem sido detectados em águas superficiais na região (Lima et al., 2015; Gomes et al., 2022) e de possuírem alta afinidade com partículas sedimentares, onde passam a se depositar (Hoffman et al., 2002; Venturini & Tommasi, 2004). Gomes et al. (2022) observaram concentrações de herbicidas orgânicos em níveis perigosos em águas superficiais

influenciadas pelo acercamento de atividades agrícolas e ausência de tratamento de águas residuais urbanas, em regiões do Alto Rio Doce. Lima et al. (2015), também observaram ocorrência de HPAs em águas da bacia do rio Doce em amostras de águas coletadas antes do rompimento da barragem do Fundão. *C. fluminea* são capazes de bioacumular esses compostos orgânicos, bem como compostos organofosforados (Narbonne et al., 1996; Li et al., 2008), podendo apresentar desequilíbrio bioquímico através do aumento de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e diminuição de AChE, pela atuação dessas substâncias no sistema nervoso (Oliveira et al., 2015; Beltran & Pocsidio, 2009). Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo ressaltam a necessidade de um diagnóstico mais amplo da Bacia do Rio Doce, visando identificar as fontes poluidoras, assim como determinar e quantificar os variados tipos de poluentes que podem estar presentes, de modo a oferecer dados mais robustos para ações de gestão da bacia e recuperação ambiental.

Os sedimentos dessa coleta apresentaram níveis anômalos de Mn e Cd no trecho do Alto RD, porém não relacionados aos efeitos de redução da atividade da enzima. Na região onde J4 está inserido, prevalecem as atividades de mineração (Borba et al., 2000), porém alguns autores já observaram níveis consideráveis de outros contaminantes persistentes em água e sedimentos ao longo da bacia, como fármacos, HPAs e pesticidas, devido ao lançamento de efluentes não tratados de regiões urbanas industrializadas e escoamento agrícola, podendo causar efeitos neurotóxicos relacionados à uma mistura de contaminantes nos diferentes compartimentos da bacia do rio Doce, como metais, organofosforados, hidrocarbonetos e enriquecimento de matéria orgânica (Gomes et al., 2022; Yamamoto et al., 2023). Os efeitos inibitórios de acetilcolinesterase foram mais expressivos em J14, à jusante de aglomerados industriais como Vale do Aço e de atividades agrícolas do Médio RD, revelando que os efeitos observados possivelmente não foram causados por influência dos rejeitos de mineração.

C. fluminea pode apresentar níveis alterados de AChE na presença de contaminantes orgânicos, resultantes de atividades antrópicas e presentes em efluentes domésticos e industriais, devido à inibição de sua atividade (Aguirre-Martinez et al., 2018). Bacias hidrográficas sofrem vários e intensos impactos ambientais devido as diferentes atividades antrópicas em seu entorno (Davila et al, 2020; Yamamoto et al., 2023). A bacia do rio Doce, além de fornecer serviços ecossistêmicos, comporta um dos maiores aglomerados siderúrgico do país e sustenta atividade como pecuária e agricultura, com uso intensivo de defensores agrícolas, fármacos veterinários, pesticidas e lançamento

de esgotos urbanos e industriais (Santolin et al., 2015). Dessa forma, os resultados deste trabalho sugerem que a combinação de contaminantes na BRD contribuem para os efeitos neurotóxicos observados em *C. fluminea*. Alguns trabalhos, como Li et al. (2018), relataram que numa mistura de compostos organofosforados com Cd, em sedimentos, os compostos orgânicos são capazes de inativar a regulação positiva do RNAm de AChE, induzida pelo metal, em *C. fluminea*, promovendo ainda a inibição da atividade da enzima. Cataldo et al. (2001) observaram taxas de mortalidade significativamente aumentadas para jovens de *C. fluminea* expostos a sedimentos influenciados por atividades antrópicas na Bacia do Paraná, onde as concentrações de uma mistura de xenobióticos eram maiores para ambientes onde o adensamento urbano e industrial era mais acentuadas. Num estudo realizado com diluição de inseticida em água, Shan et al. (2020) observaram alterações histopatológicas e efeitos negativos no comportamento de *C. fluminea* a partir da inibição da AChE após 30 dias de exposição a 2mgL^{-1} de imidacloprid, além do aumento significativo de atividades de enzimas atuantes na defesa contra ROS.

Finalmente, alguns autores também relataram poucos efeitos sobre os organismos expostos aos sedimentos influenciados pelos rejeitos de mineração de Mariana. Almeida et al. (2021) não observaram efeitos significativos em embriões de *Danio rerio* expostos aos rejeitos de mineração coletados após 10 dias da tragédia. Mendes et al. (2020) observaram efeitos crônicos em *Ceriodaphnia dubia*, relacionados ao material particulado em suspensão em amostras coletadas na BRD, mas com tendência a queda dos efeitos ao longo do tempo, com baixa frequência de efeitos agudos em *Vibrio fisheri*, *Daphnia similis* e *Danio rerio*, expostos em amostras de águas coletadas entre 2015 e 2017, assim como foi observada pouca ou nenhuma letalidade para neonatos de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* expostos em águas e sedimentos (ISA) da BRD, neste trabalho (capítulo 1).

Os sedimentos influenciados pelos rejeitos de mineração não estão livres de uma mistura de contaminantes metálicos (Duarte et al., 2021; Vieira et al., 2022; Yamamoto et al., 2022). Assim, os efeitos significativos em *C. fluminea* expostos em sedimentos de pontos do Médio e Baixo rio Doce, observado nesse trabalho, não relacionado aos metais medidos, conforme FA/PCA, podem ser explicados pela ocorrência de uma mistura tóxica de contaminantes orgânicos e inorgânicos, atribuídos principalmente às atividades agrícolas e industriais da região. No entanto, não se pode descartar que a presença de elementos liberados a partir dos resíduos de Fundão possa ter contribuído para

potencializar os efeitos tóxicos causados por poluentes emitidos por outras fontes, uma vez que o resultado, no ambiente, é a mistura de substâncias lançadas pelas diferentes fontes, à qual os organismos estão permanentemente expostos.

Conclusão

Os resultados mostram baixa incidência de efeitos bioquímicos sobre *C. fluminea* exposta a sedimentos do Rio Doce, e em geral os efeitos não tiveram relação direta com metais advindos dos rejeitos. Alguns efeitos neurotóxicos observados em organismos expostos em amostras da 3ª campanha (um ano após o rompimento da barragem), não apresentaram relação com os metais analisados no trabalho, sugerindo que a diminuição de AChE pode estar associada ao uso de pesticidas e ao escoamento agrícola. Portanto, foram detectados efeitos não relacionados ao rejeito de mineração liberado em 2015 pelo rompimento da barragem do Fundão. Esses resultados, possivelmente se deveram a outros contaminantes não medidos e originados de outras fontes. Os resultados, portanto, reforçam uma baixa disponibilidade de metais nos sedimentos do Rio Doce para bivalves *C. fluminea*, sendo que em geral a presença dos metais não foi capaz de gerar efeitos adversos nos organismos, causando, em alguns casos, a ativação de sistemas de detoxificação.

Referências

- Abaychi, J. K., & Mustafa, Y. Z. (1988). The asiatic clam, *Corbicula fluminea*: An indicator of trace metal pollution in the Shatt al-Arab River, Iraq. *Environmental Pollution*, 54(2), 109–122. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(88\)90141-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(88)90141-8)
- Abessa, D. M. S. (2002). Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, SP.
- Abessa, D. M. S. (2016). Avaliação de risco ecológico no Rio Ribeira de Iguape (SP, Brasil) devido à contaminação por antigas atividades de mineração. Tese de Livre Docência, UNESP. São Vicente, SP.
- Aguirre-Martínez, G. V., André, C., Gagné, F., & Martín-Díaz, L. M. (2018). The effects of human drugs in *Corbicula fluminea*. Assessment of neurotoxicity, inflammation, gametogenic activity, and energy status. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148(November 2017), 652–663. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.042>
- Albuquerque, C. D. (2007). Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação na Baía de Guanabara (Doctoral dissertation).
- Almeida, V. O. de, Pereira, T. C. B., Teodoro, L. de S., Escobar, M., Ordovás, C. J., dos Santos,

- K. B., ... Schneider, I. A. H. (2021). On the effects of iron ore tailings micro/nanoparticles in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 759, 143456. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143456>
- Arantes, I. A., Pinto, M. T. C., Mangabeira, P. A., Grenier-Loustalot, M. F., Veado, M. A. R. V., & Oliveira, A. H. (2009). Mercury concentration in fish from Piracicaba River (Minas Gerais, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, 156(1–4), 119–130. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0468-2>
- Azevedo, R. D., Falcão, K. V., Assis, C. R., Martins, R. M., Araújo, M. C., Yogui, G. T., ... & Bezerra, R. S. (2021). Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase. *Chemosphere*, 263.
- Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316–1322.
- Beltran, K. S., & Pocsidio, G. N. (2010). Acetylcholinesterase activity in *Corbicula fluminea* Mull., as a biomarker of organophosphate pesticide pollution in Pinacanao River, Philippines. *Environmental Monitoring and Assessment*, 165(1–4), 331–340. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0949-y>
- Ben Ameer, W., de Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., ... Borràs, M. (2012). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 64(2), 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.11.026>
- Bonnail, E., Sarmiento, A. M., DelValls, T. A., Nieto, J. M. & Riba, I. (2016). Assessment of metal contamination, bioavailability, toxicity and bioaccumulation in extreme metallic environments (Iberian Pyrite Belt) using *Corbicula fluminea*. *Science of The Total Environment*, 544, 1031–1044.
- Bonnail, E., Cunha Lima, R., Bautista-Chamizo, E., Salamanca, M. J., & Cruz-Hernández, P. (2018). Biomarker responses of the freshwater clam *Corbicula fluminea* in acid mine drainage polluted systems. *Environmental Pollution*, 242, 1659–1668. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.111>
- Borba, R. P., Figueiredo, B. R., Barry, R., & Matschullat, J. (2000). Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. *Revista Brasileira de Geociências*, 30(3), 554–557.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blaco, J., Porte, C., Sarasquete, C. & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of The Total Environment*, 247, 295–311.
- Cardoso, O. G., Falsarella, L. N., Chiroque-Solano, P. M., Porcher, C. C., Felipe P. Leitzke, F. P., Wegner, A.C., Carelli, T., Salomon, P. S., Bastos, A.C., Sá, F., Fallon, S., Salgado, L. T., Moura, R.L. (2022). Coral growth bands recorded trace elements associated with the Fundão dam collapse. *Science of The Total Environment*, 807, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150880>

- Carmo, F. F. do, Kamino, L. H. Y., Junior, R. T., Campos, I. C. de, Carmo, F. F. do, Silvino, G., ... Pinto, C. E. F. (2017). Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in Ecology and Conservation*.
- Carvalho, G. O., Pinheiro, A. de A., de Sousa, D. M., Padilha, J. de A., Souza, J. S., Galvão, P. M., ... 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. <https://doi.org/10.17807/orbital.v10i4.1081>
- Cataldo, D., Colombo, J. C., Boltovskoy, D., Bilos, C., & Landoni, P. (2001). Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environmental Pollution*, 112(3), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00145-7)
- CETESB. (1995). Norma técnica L6.160 de Nov/1995. Sedimentos: determinação da distribuição granulométrica - método de ensaio. São Paulo, 15p.
- Coelho, Tádzio. (2012). Mineração e dependência no quadrilátero ferrífero. *Revista Intratextos*, 3(1), 128-146.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério Do Meio Ambiente (CONAMA) (2012). Resolução nº 454. 01 de novembro de 2012. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2012/res_conama_454_2_012_materialserdragadoemaguasjurisdicionaisbrasileiras.pdf.
- Consórcio Ecoplan Lume. (2010). Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do Rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da bacia do Rio Doce. Relatório Final - Volume I
- Cruz, A. C. F., Pauly, G. F. E., Araujo, G. S., Gusso-Choueri, P., Fonseca, T. G., Campos, B. G., ... Abessa, D. M. S. (2021). Metal Bioaccumulation by the Neotropical Clam *Anomalocardia flexuosa* to Estimate the Quality of Estuarine Sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03062-x>
- 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. *Science of the Total Environment*, 709, 136151. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136151>
- Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P., Dhadialla, T. & Hutchinson, T. (2001). Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* Bll cell in vitro assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2038-2046.
- Doherty, F. G. (1990). The Asian clam, *Corbicula* spp. as a biological monitor in freshwater environments. *Environ Monit Assess*, 15, 143-181.
- Duarte, E. B., Neves, M. A., de Oliveira, F. B., Martins, M. E., de Oliveira, C. H. R., Burak, D. L., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- Ekelund Ugge, G. M. O., Jonsson, A., Olsson, B., Sjöback, R., Berglund, O. (2020)

- Transcriptional and biochemical biomarker responses in a freshwater mussel (*Anodonta anatina*) under environmentally relevant Cu exposure. *Environ Sci Pollut* 27, 9999-10010.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7, 88–95.
- Escobar, H. (2015). Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. *Science.* 350, 1138-1139.
- Eskenazi, B., Bradman, A., & Castorina, R. (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environmental Health Perspectives*, 107(3), 409–419. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s3409>
- Espindola, H. S.; Nodari, E. S.; Santos M. A. (2019) Rio Doce: riscos e incertezas a partir do desastre de Mariana (MG) Rio Doce: Risks and Uncertainties of the Mariana Disaster (MG). 39, 141-162. <https://doi.org/10.1590/1806-93472019v39n81-07>
- Farias, C. E. G. (2002). Mineração e meio ambiente no Brasil. Relatório do CGEE/PNUD. v. 76, p. 2
- Fernandes, G. W., Goulart, F. F., Ranieri, B. D., Coelho, M. S., Dales, K., Boesche, N., ... & Soares-Filho, B. (2016). Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação*, 14(2), 35-45.
- Ferrari, B., Radetski, C. M., Veber, A. M., & Ferard, J. F. (1999). Ecotoxicological assessment of solid wastes: A combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6), 1195–1202. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1999\)018<1195:EAOSWA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1999)018<1195:EAOSWA>2.3.CO;2)
- Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D.C., Dunbar, M.J., Edwards, F.K. & Grey, J. et al. (2011). Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems: The good, the bad and the ugly. *Advances in Ecological Research*, v. 44, p. 1-68.
- Fournier, E., Adam, C., Massabuau, J.C. & Garnier-Laplace, J. (2005). Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species. *Aquatic Toxicology*, 72, 251-260.
- Gabriel, F., Hauser-Davis, R. A., Soares, L., Mazzuco, A. C. A., Chavez Rocha, R. C., Saint Pierre, T. D., ... Bernardino, A. F. (2020). Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.10266>
- GFT - Grupo de Força-Tarefa. (2015). Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da Barragem de Fundão em Mariana – MG.
- 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, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.801599>
- Graney, R. L., Cherry, D. A. & Cairns, L. (1989). The influence of substrate, pH, diet and temperature upon cadmium accumulation in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in laboratory artificial streams. *Water Research*, 18(7), 833-842.
- Guimarães, V., & Sígolo, J. B. (2008). Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbicula fluminea*) Rio Ribeira de Iguape-SP. *Química nova*, 31(7) 1696-1698
- Guo, X., Feng, C. (2018). Biological Toxicity response of Asian Clam (*Corbicula 637 fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. *Science of the Total Environment* 638 631–

- 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*, 22(22), 18047–18065. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4911-y>
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., Santos, G. S., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., ... de Sousa Abessa, D. M. (2016). Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1–2), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.025>
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>.
- Hoffman, D., Rattner, B. A., Burton Jr., G.A., Cairns Jr., J. (2003). Handbook of ecotoxicology 2nd ed. LEWIS PUBLISHERS.
- Huber, P. C.; Almeida, W. P.; Fátima, A. de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170-1179, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>
- IBAMA. Laudo técnico preliminar. Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. 2015.
- IGAM - Agência Estadual de Águas de Minas Gerais (2015). Monitoramento da qualidade das águas superficiais do Rio Doce no Estado de Minas Gerais.
- INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. (2015). Satélites mostram a trajetória de sedimentos no Rio Doce.
- Lacerda, F. M., & Roeser, H. M. P. (2014). Análise geoquímica e ambiental para descrição da Bacia do Rio Oratórios (MG). *Geochimica Brasiliensis*, 28(2), 227–236. <https://doi.org/10.5327/Z0102-9800201400020010>
- Li, D., Wang, P., Wang, C., Fan, X., Wang, X., & Hu, B. (2018). Combined toxicity of organophosphate flame retardants and cadmium to *Corbicula fluminea* in aquatic sediments. *Environmental Pollution*, 243, 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.076>
- Li, T., Huang, S., Sun, F., Zha, J., Qiao, M., Wang, Z. (2008). Bioaccumulation by *Corbicula fluminea* of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments in Meiliang Bay, Taihu Lake. *Acta Scientiae Circumstantiae* 28(11):2354-2360
- Losekann, C., Dias, T.H. & Camargo, A.V.M. (2020). The Rio Doce mining disaster: Legal framing in the Brazilian justice system. *The Extractive Industries and Society*, v.7, p. 199-208.
- Luczak, C., Janquin, M. A., & Kupka, A. (1997). Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, 345(1), 87–94. <https://doi.org/10.1023/A:1002902626798>
- Luoma, S. N., & Rainbow, P. S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology*, 39(7), 1921–

1931. <https://doi.org/10.1021/es048947e>
- Mazzei, E. F., Bertoncini, A. A., Pinheiro, H. T., Machado, L. F., Vilar, C. C., Guabiroba, H. C., ... Joyeux, J. C. (2017). Newly discovered reefs in the southern Abrolhos Bank, Brazil: Anthropogenic impacts and urgent conservation needs. *Marine Pollution Bulletin*, 114, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.059>
- Mcfarland, V. A.; Inouye, S. L.; Lutz, C. H.; Jarvis, A. S.; Clarke J.U.; Mccant, D. D. (1999). Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37, 236-241.
- Mendes, L. B., Mello, F. A., Chagas, K. R., Campelo, R. P. M., Medeiros, L. C. C., Smith, R. E. W., & Furley, T. H. (2020). Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the Fundão Dam Collapse. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 608–614. <https://doi.org/10.1002/ieam.4291>
- Silva, J. V., Andrade, M. J. G., In: Milanez, B., & Losekann, C. (2016). Desastre no vale do Rio Doce. *Editora Letra e Imagem*, 437.
- 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.
- Montserrat, J. M., Martinez, P. E., Geracitano, L. A., Amado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L., Chavez, I. S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J. & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 164, 221-234.
- Narbonne, J. F., Djomo, J. E., Ribera, D., Ferrier, V., & Garrigues, P. (1999). Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42(1), 1–8. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1701>
- Nascimento Jr., D. R. do, Giannini, P. C. F., & Tanaka, A. P. B. (2008). Mudanças morfológicas da extremidade NE da Ilha Comprida (SP) nos últimos dois séculos. *Geologia USP. Série Científica*, 8(1), 25–39. <https://doi.org/10.5327/z1519-874x2008000100003>
- Nkosi, V. (2018). How mine dumps in South Africa affect the health of communities living nearby. *The Conversation*, v.2.
- Novelli, A., Vieira, B. H., Cordeiro, D., Cappelini, L. T. D., Vieira, E. M., & Espíndola, E. L. G. (2012). Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere*, 86(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.047>
- Olive, P. L. (1998). The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation, 150, 42-51.
- Oliveira, C., Vilares, P., & Guilhermino, L. (2015). Integrated biomarker responses of the invasive species *Corbicula fluminea* in relation to environmental abiotic conditions: a potential indicator of the likelihood of clam's summer mortality syndrome. *Inform*, 1–2.
- Oliveira, L. F., Santos, C., Risso, W. E., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). Triple-mixture of Zn, Mn, and Fe increases bioaccumulation and causes oxidative stress in freshwater neotropical fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(6), 1749–1756. <https://doi.org/10.1002/etc.4133>

- Pires, J. M. M., Lena, J. C. D., Machado, C. C., & Pereira, R. S. (2003). Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco Mineração: estudo de caso da barragem de Germano. *Revista Árvore*, 27, 393-397.
- PIRH – Doce. Plano integrado de recursos hídricos da Bacia hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da Bacia do rio Doce. Consórcio ECOPLAN-LUME. 2010.
- Queiroz, H. M., Nóbrega, G. N., Ferreira, T. O., Almeida, L. S., Romero, T. B., Santaella, S. T., ... Otero, X. L. (2018). The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? *Science of the Total Environment*, 637–638, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>
- Reeder, R. J., Schoonen, M. A. A., & Lanzirotti, A. (2006). Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64, 59–113. <https://doi.org/10.2138/rmg.2006.64.3>
- Rhodes, V. (2010). Distribuição de mercúrio e arsênio nos sedimentos da área afetada por garimpo de ouro–Rio Gualaxo do Norte, Mariana, MG, 93. Retrieved from <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/2274>
- Richard, E. C., de Aguiar Duarte, H., Calderucio Duque Estrada, G., Bechtold, J. P., Gusso Maioli, B., Araujo de Freitas, A. H., ... Melges Figueiredo, L. H. (2020). Influence of Fundão Tailings Dam Breach on Water Quality in the Doce River Watershed. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 583–595. <https://doi.org/10.1002/ieam.4311>
- Rocha, C. T., Souza, M.M. (2012). The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* from defence to repair biomarkers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 56-67.
- Rodrigues, A. S. de L. (2012). Caracterização da bacia do Rio Gualaxo do Norte, MG, Brasil: Avaliação geoquímica ambiental e proposição de valores de background, 162.
- Rover Jr, L., Hoehr, N. F., Vellasco, A. P. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova*, 24(1), 112-9
- Santana, C. L. (2008). Universidade De São Paulo Faculdade De Filosofia, Letras E Ciências Humanas Departamento De Geografia Programa De Pós-Graduação Geografia Física, 1–297.
- 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>
- Santos, G. P. C., de Assis, C. R. D., Oliveira, V. M., Cahu, T. B., Silva, V. L., Santos, J. F., ... & Bezerra, R. S. (2022). Acetylcholinesterase from the charru mussel *Mytella charruana*: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as in vitro biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 252
- Santos, K. C. & Martinez, C. B. R. (2014). Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 100, 7-14.

- Salvador, G. N., Leal, C. G., Brejão, G. L., Pessali, T. C., Alves, C. B. M., Rosa, G. R., ... Montag, L. F. de A. (2020). Mining activity in Brazil and negligence in action. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 18(2), 139–144.
<https://doi.org/10.1016/j.pecon.2020.05.003>
- Sedlak, J., Lindsay, R. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192–205.
- 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). *Environment Pollution*, 218, 813–825.
- Shan, Y., Yan, S., Hong, X., Zha, J., & Qin, J. (2020). Effect of imidacloprid on the behavior, antioxidant system, multixenobiotic resistance, and histopathology of Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*, 218
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105333>
- 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>
- Siqueira-Gay, J., Sonter, L. J. & Sánchez, L. E. (2020). Exploring potential impacts of mining on forest loss and fragmentation within a biodiverse region of Brazil's northeastern Amazon. *Resources Policy*, 67.
- Taylor, M. P., Mould, S. A., Kristensen, L. J., & Rouillon, M. (2014). Environmental arsenic, cadmium and lead dust emissions from metal mine operations: Implications for environmental management, monitoring and human health. *Environmental Research*, 135, 296–303.
- Tesser, M. E., de Paula, A. A., Risso, W. E., Monteiro, R. A., do Espírito Santo Pereira, A., Fraceto, L. F., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2020). Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. *Science of the Total Environment*, 704, 135332.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135332>
- Thomé, J. A., De Martini, E. A., Junior N. O. L. (2016). Avaliação inicial dos impactos da pluma de rejeitos da Samarco nos ambientes estuarinos, costeiros e marinhos. In: Simpósio sobre a biodiversidade da Mata Atlântica – SIMBIOMA, 5., Santa Teresa, Brasil, Anais, 34–48.
- USEPA. (1996). Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. *The Journal of the Japan Society for Bronchology*. 18(7), 723.
- USEPA. (2004). Contamination Sediments Science Priorities: United States Environmental Protection Agency Science Policy Council., 172.
- Van Der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., & Vermeulen, N. P. E. (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: Pollution-induced responses. *Aquatic Toxicology*, 36(3–4), 189–222.
[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00802-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00802-8)
- Venturini, N., & Tommasi, L. R. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 48(1–2), 97–107.
[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00331-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00331-X)
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N., & Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 97(1), 37–42.

- Vieira, C. E. D., Marques, J. A., da Silva, N. G., Bevitório, L. Z., Zebral, Y. D., Maraschi, A. C., ... Sandrini, J. Z. (2022). Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. *Science of the Total Environment*, 832(March). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>
- Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D. A., Raimundo, C. C. M., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.077>
- Villar, C., Stripeikis, J., D’Huicque, L., Tudino, M., Troccoli, O., & Bonetto, C. (1999). Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de la Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia*, 416(1857), 41–49. <https://doi.org/10.1023/A:1003811223880>
- Wentworth, C. C. K. (1922). A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, 30(5), 377–392. <https://doi.org/10.2307/30063207>
- Wills, E. D. (1987) Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Mullock B, Snell K (ed) *Biochemical toxicology a practical approach*. IRL Press, Oxford, 127–150
- Xie, Y., Chen, H., Zheng, S., Zhang, X., & Mu, S. (2018). Molecular characterization of cu/Zn SOD gene in Asian clam *Corbicula fluminea* and mRNA expression and enzymatic activity modulation induced by metals. *Gene*, 663(December 2017), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.044>
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Figueira, R. C. L., ... 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., Thaisa, A., Souza, C., Carvalho, V. De, Paula, S. De, Beverari, I., ... Abessa, D. S. (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(March), 157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>
- Zhang Y, Song JM, Yuan HM, Xu YY, He ZP, Duan LQ. Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010b;30:19–25
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. & Jiang, G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606, 135–150

Anexo I

Tabela S7 - Parâmetros físico-químicos das exposições de *C. fluminea*.

1ª				
Campanha	Inicial		Final	
Amostra	pH	O2 (ppm)	pH	O2 (pmm)
M2	6,88	6,7	7,12	5,88
J10	6,72	6,3	7,22	6

3ª				
Campanha	Inicial		Final	
Amostra	pH	O2 (ppm)	pH	O2 (pmm)
M2	6,44	6,8	7,14	5,3
J2	6,88	6,7	7,53	6
J4	6,54	6,8	7,12	5,9
J5	6,71	6,4	7,18	5,6
J11	6,37	6,8	7,63	5,7
J12	6,9	6,8	7,84	5,8
J13	6,3	6,7	7,11	5,2
C1	6,9	6,9	7,41	5,4
C2	6,7	6,8	7,3	5,7

4ª Campanha	Inicial		Final	
Amostra	pH	O2	pH	O2
Referência	7,25	4,41	6,24	4,86
Gualaxo	7,62	5,49	7,47	4,7
Candongá	7,33	5,42	7,95	4,6
Naque Gov	7,51	5,22	7,82	4,33
Valadares	7,35	5,73	8,29	4,62
Aimores	7,27	5,18	7,47	4,7
Colatina	7,19	5,15	7,92	4,1
Linhares	7,34	5,19	7,93	4,33

5ª campanha	Inicial		Final	
Amostra	pH*	O2 ppm	pH	O2 ppm
Referência	6,93	6,65	7,96	8,08
Gualaxo	6,93	6,36	7,84	8,01
Candongá	6,93	6,56	8,17	7,94
Naque Gov	6,93	6,64	8,02	8,21
Valadares	6,93	6,57	7,67	8,2
Aimores	6,93	6,8	7,34	7,82
Colatina	6,93	6,59	7,38	8,15
Linhares	6,93	6,55	7,76	7,26

*Água reconstituída

Capítulo 4 – Análise de toxicidade em embriões de zebrafish em águas e elutriato. Artigo em elaboração referente à bolsa Fapesp Processo 2018/23279-4.

Ecotoxicological assessment of waters and sediments from Rio Doce after the Fundão Dam rupture using embryos of zebrafish

Guacira de F. E. Pauly ^a; Aline M. Z. de Medeiros ^b; Flávia Y. Yamamoto ^a; Denis M. S. Abessa ^a

^a Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista, São Vicente-SP, Brasil

^b Technological Development Analyst II · Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM)

Resumo

Uma das atividades responsáveis pela poluição do ambiente aquático da Bacia do Rio Doce (BRD) é a mineração. O rompimento da barragem do Fundão em novembro de 2015 deixou rastros de destruição, com alteração de propriedades físico-químicas no ecossistema aquático, além de grandes questionamentos sobre os efeitos na biota a médio e longo prazo. O objetivo do trabalho foi avaliar se amostras de águas coletadas ao longo do Rio Doce, após o rompimento da barragem de Fundão, poderiam afetar o desenvolvimento de embriões de *D. rerio*. Foram usadas amostras de água coletadas imediatamente e 6 meses após o rompimento, em pontos distribuídos ao longo da BRD, tendo sido realizados experimentos com ovos recém-fecundados, conduzidos em placas com poços contendo 2ml de amostra. Não foram observados efeitos agudos significativos nos embriões e larvas de *D. rerio* expostos às águas coletadas ao longo do Rio Doce logo após o derramamento de minério de ferro no ambiente, tampouco foram verificados efeitos crônicos. Para as mostras coletadas seis meses após o rompimento, não foram observados efeitos adversos nos organismos. Os resultados sugerem que apesar das concentrações de alguns metais serem altas nas amostras de água, possivelmente os elementos estavam pouco disponíveis, não causando alteração nos organismos expostos.

Palavras-chave: *Danio rerio*, metais, efeito crônico, poluição.

Introdução

A bacia do Rio Doce, inserida entre os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, sofre inúmeros impactos ambientais devido às atividades antrópicas que há décadas afetam as águas e diminuem a cobertura vegetal, além de serem fontes de poluição para ecossistemas próximos (IGAM, 2015). Uma das atividades predominantes em MG, apontada como fontes potencial de contaminação, é a mineração (Parra et al., 2007).

Depois do rompimento da barragem do Fundão, em 05 de novembro de 2015, em Mariana-(MG), o cenário de devastação do ambiente natural levou a comunidade científica a levantar dados sobre os efeitos do maior desastre ambiental envolvendo atividades de mineração da história do país, até então, a fim de inferir os efeitos negativos na biota, cujo levantamento era (e é) extremamente importante para orientar políticas públicas voltadas à recuperação do ambiente (Drummond & Subirá, 2021). Alguns autores afirmam que o rejeito não é tóxico (Almeida et al., 2018), outros declararam que a presença de metais ao longo da Bacia do Rio Doce (BRD) constitui ‘uma bomba relógio’ (Queiroz et al, 2018), com risco iminente para o ambiente, os seres humanos e as atividades econômicas, mas o fato é que avaliar os impactos reais causado pela liberação de um volume enorme rejeitos de minério de ferro, de forma pontual e massiva, num ambiente dinâmico e já cronicamente impactado por múltiplas fontes, inclusive por atividades de mineração, se torna um desafio bastante complexo e que requer o uso de múltiplas abordagens.

Os peixes têm sido usados como organismos modelo para estudos ecotoxicológicos devido ao contato direto com o meio aquático e à capacidade de acumular poluentes em seus tecidos (Fisk et al., 2001), além de sua importância ecológica e econômica. Estudos têm relatado efeitos tóxicos em várias espécies de peixe expostas a contaminantes (Arndt et al., 2014; Clemow & Wilkie, 2015; Gusso-Choueri et al., 2016). A espécie *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) é um modelo largamente utilizado em análises aplicadas em diversas áreas do conhecimento, incluindo a ecotoxicologia, podendo gerar dados sobre genotoxicidade, neurotoxicidade, mortalidade, e também embriotoxicidade (Braunbeck, 2005; Wang et al., 2017). É uma espécie tropical de água doce, conhecida vulgarmente por “Zebrafish” ou paulistinha, sendo identificada pelo padrão de coloração prateada com listras azuis-escuras, podendo chegar a 5 cm de comprimento (Creaser, 1934; Cavalcante et al., 2017; Lu et al., 2018).

Indivíduos adultos de zebrafish são de fácil obtenção e produzem ovos transparentes em abundância (entre 100 e 200 ovos por dia), permitindo assim a

realização de estudos ecotoxicológicos que investigam diversos parâmetros (ou *endpoints*), tais como batimentos cardíacos, deformações da cauda, nível de transparência, ainda no estágio inicial do desenvolvimento do organismo (Braunbeck, 2004). Além disso, adaptam-se facilmente em cultivos de laboratórios, suportam a variadas condições de temperatura, pH, dureza da água, e seus embriões toleram concentrações de 2 mg/L de oxigênio dissolvido no meio aquoso. Também é uma espécie sensível às substâncias químicas e podem ser mantidos em um grande número num mesmo aquário. Embriões, larvas e adultos de *Danio rerio* são comumente utilizados para avaliar a qualidade ambiental e a toxicidade de compostos inorgânicos e oligoelementos presentes no ambiente (Spence et al., 2008), como a contaminação por metais gerada pelas atividades de mineração (Hatje et al., 2016). Portanto, esta espécie é adequada para uso em estudos visando estimar efeitos de poluentes, como o desastre ocorrendo após o rompimento da barragem de Fundão.

Objetivo

O objetivo geral do trabalho foi avaliar mortalidade e possíveis efeitos no desenvolvimento embrionário de embriões de *D. rerio* expostos às amostras de água coletadas na bacia do Rido Doce, um mês e seis meses após o desastre da barragem do Fundão. Para isso, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar quimicamente as amostras de água coletadas ao longo da BRD entre 2015 e 2016, de acordo com as diretrizes da USEPA 6020 (2014) (USEPA, 2014));
- Avaliar a mortalidade dos organismos expostos em amostras de água coletadas ao longo da BRD entre 2015 e 2016;
- Avaliar possíveis efeitos crônicos, por meio alterações no desenvolvimento de embriões expostos às águas da BRD coletada entre 2015 e 2016.
- Verificar relação entre a contaminação das águas e os efeitos tóxicos sobre os organismos.

Material e métodos

Area de estudo

A Bacia do Rio Doce pode ser dividida em Alto, Médio e Baixo Rio Doce. A região do Alto Rio Doce se estende desde as nascentes do rio, localizadas na Serra da Mantiqueira, até o Rio Matipó, em Raul Soares (MG) (Vieira, 2009). Essa região é marcada por atividades de mineração, agropecuária, barragens para geração de energia

elétrica e ocupação urbana (IGAM, 2017). O Médio Rio Doce possui atividades industriais, no Vale do Aço, e é caracterizado por uma maior urbanização, compreendendo a cidade de Governador Valadares, e instalações de usinas hidrelétricas, numa região que compreende do Rio Matipó até a divisa dos estados de MG e ES, em Baixo Guandu (IGAM, 2017; Vieira, 2009). Já a região do Baixo Rio Doce apresenta atividades predominantemente agrícolas, se estendendo desde a Usina Hidrelétrica de Mascarenhas em Baixo Guandu, até a sua foz no Oceano Atlântico, em Regência, no município de Linhares, litoral norte do ES (Vieira, 2009).

A malha amostral definida para coletas de amostras de água envolve toda a extensão da Bacia do Rio Doce, compreendendo desde a montante da Barragem do Fundão até a Foz do rio. Foram realizadas 2 campanhas de amostragem, a primeira foi realizada entre novembro e dezembro de 2015 (logo após o desastre) e a segunda, entre abril e março de 2016. Todas as amostras de água foram coletadas a 30 cm da superfície, através de garrafas de teflon, sendo acondicionadas em garrafas translúcidas de plástico com capacidade de 1L e acondicionadas a 4°C até a realização das análises.

Análises químicas

Foram realizadas análises químicas das águas amostradas nos testes de exposição de embriões de zebrafish, conforme descrito no Apêndice A - Capítulo 1 deste trabalho, utilizando espectrometria de massa por plasma induzido (ICP-MS), seguindo as diretrizes da USEPA 6020 (2014) (USEPA, 2014) e SMEWW 3125 B (1998).

Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish

A análise da toxicidade das amostras sobre o efeito no desenvolvimento de embriões de *D. rerio* foi realizada de acordo com a diretriz de teste 236 (OECD, Fish Embryo Acute Toxicity Test - FET). Adultos selvagens de zebrafish (*Danio rerio*) foram fornecidos pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), onde os ensaios também foram realizados. O experimento teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista – Campus do Litoral Paulista #02/2022 (anexo).

Machos e fêmeas adultos foram mantidos separadamente, em aquário de plástico, com água reconstituída deionizada, em temperatura de 28 °C (± 1) e fotoperíodo 14:10 (claro:escuro), sendo alimentados duas vezes por dia com ração e *Artemia* sp. Para obter os ovos, machos e fêmeas (na proporção 1:1) foram colocados no mesmo aquário e

separados por uma divisória. Esta divisória é então retirada próximo ao horário programado do acendimento das luzes da sala. Para evitar a ingestão dos ovos pelos adultos, foram colocadas bolas de vidro no fundo do aquário, permitindo a precipitação dos ovos nos espaços intersticiais. Após 1 hora, os ovos foram recolhidos, lavados e transferidos para placas para serem selecionados quanto a sua viabilidade.

Ovos recém-postos com 4h pós-fertilização (hpf) foram selecionados e verificados quanto sua viabilidade sob estereomicroscópio. Foram considerados inviáveis os ovos com desenvolvimento atrasado, com desenvolvimento comprometido ou morto (coagulado) (figura 1). Depois disso, cada ovo foi transferido para 1 poço em uma microplaca de 24 poços, (figura 2) contendo 2 ml de amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando em 30 poços/organismos para cada tratamento, e mantidos a 28 °C sob 14h:10h de fotoperíodo (claro:escuro).

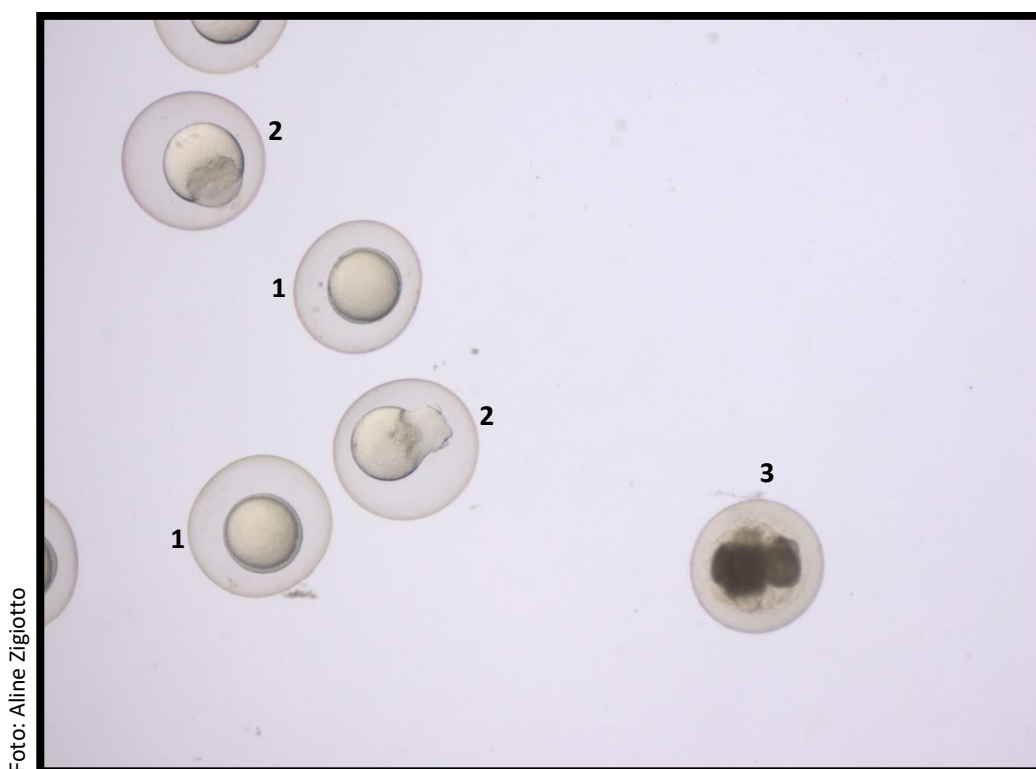


Figura 1 – Ovos viáveis e inviáveis de *Danio rerio*; 1) ovo viável; 2) ovo inviável (má formação); 3) ovo morto (coagulado).

A exposição foi realizada sem renovação das amostras nos poços, e o controle negativo foi realizado com água reconstituída (96 mg L⁻¹ NaHCO₃, 60 mg L⁻¹ MgSO₄, 4 mg L⁻¹ KCl, 60 mg L⁻¹ CaSO₄ e pH 7,5 ± 0,5). Após 96 horas de exposição, os seguintes parâmetros foram avaliados: malformação, edema, comprimento total e mortalidade.

Foram realizados experimentos com 10 amostras de água da primeira campanha (M2, J1, J3, J4, J11, J12, J14, J15 e J16) e 8 amostras da segunda campanha (J1, J2, J4, C1, J5, J11, J13 e J15). O controle negativo deve apresentar >70% dos ovos fecundados. Também foram medidos valores de pH de cada experimento.

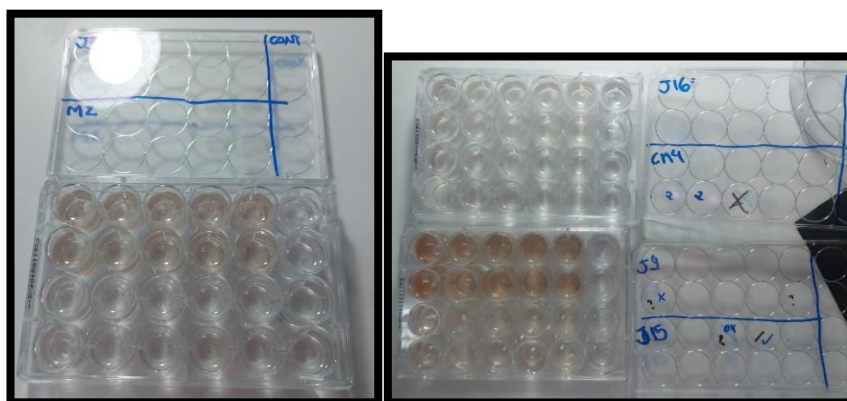


Figura 2 - Teste de toxicidade com exposição de embriões de zebrafish às amostras de água coletadas em áreas influenciadas pelo rejeito de mineração da barragem do Fundão. Foi utilizado controle negativo em todas as placas onde havia exposição às amostras.

Concomitantemente aos ensaios de toxicidade, foi realizado teste de sensibilidade com substância de referência, seguindo as diretrizes da OECD (2013). Para isso, a substância de referência, 3,4-dichloroaniline (3,4 DCA) foi diluída primeiramente em etanol, numa solução estoque de 10mg/ml. Depois, 16µL dessa solução estoque foram diluídos em 40ml do meio de cultivo (água reconstituída de dureza moderada), a fim de se obter a mais alta concentração de 3,4 DCA com 0,04% de etanol no máximo. Assim, foram colocados 2ml dessa solução, em cada poço da microplaca. Também foi realizado um controle etanol de 0,04% para exposição dos organismos. Ao final de 24h de exposição, os embriões foram avaliados para contagem dos sobreviventes.

Análise estatística

Primeiramente, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (Bartlett). Depois, foi realizada análise de variância (ANOVA) com comparação múltipla *a posteriori* pelo teste de Dunnett, para os dados homocedásticos e análise de Kruskal-Wallis *a posteriori* de Dunn's para os dados heterocedásticos (GraphPad, versão 5).

Resultados

As análises químicas das águas da primeira campanha (Table S9 – Capítulo 1) demonstram que alguns elementos como As, Cd, Mn e Ni apresentaram concentrações acima dos valores legais para água doce classe II (Brasil, 2005) em vários pontos de coleta. Mn foi o elemento que apresentou maiores concentrações e maior frequência de violação dos níveis estabelecidos pela CONAMA 357/05, enquanto as concentrações de Fe-diss ficaram abaixo dos limites legais. Com relação às águas da segunda coleta, em 2016 (6 meses depois do desastre), as concentrações foram consideravelmente menores do que na primeira, apesar da persistência das concentrações de Mn acima dos níveis permitidos pela legislação, em águas atingidas pelo rejeito no Alto e Médio Rio Doce, com os maiores valores em J13.

Teste de sensibilidade com substância de referência

O teste de sensibilidade com substância de referência 3,4 DCA apresentou 0,35% de mortalidade, e esteve dentro das concentrações da carta controle do laboratório (anexo). Os testes de exposição à 0,04% de etanol em meio de cultivo apresentou 100% de sobrevivência dos organismos.

Teste de toxicidade em água

De acordo com os resultados de letalidade, não foram observadas diferenças significativas com relação ao controle para a sobrevivência dos embriões nem para as exposições em águas coletadas 1 mês ($p=0.539$) após a liberação dos rejeitos de mineração da barragem do Fundão, nem para a exposição às amostras coletadas 6 meses após o desastre ($p=0.918$). Os valores de pH variaram de 7,2 e 7,8, para ambos os testes.



Figura 3 - Larva de *D. rerio* 96h. Foto da exposição ao tratamento controle negativo.

No entanto, os ensaios com amostras de água coletadas em 2015, demonstraram diferença com relação ao controle para o crescimento dos organismos expostos às águas do ponto J16 ($p=0,04$), ponto do BRD, atingido pela lama 15 dias antes da coleta, em 2015, e que apresentou altas concentrações de As, Cd, Mn e Ni acima dos valores permitidos pela legislação. No entanto, como a diferença em relação ao controle foi próxima de 10%, com baixa variabilidade no controle, é possível que a indicação de diferença seja decorrente de erro tipo 1 (ou seja, falso positivo)³. Para as amostras coletadas em 2016, porém, não foi observada diferença significativa com relação ao controle para o crescimento dos organismos expostos, assim como também não foi observada diferença estatística para os outros parâmetros de toxicidade crônica, como edema cardíaco e/ou deformação.

³ Em Estatística, um erro do tipo I consiste em, num testes de hipóteses, rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira e absoluta. Ou seja, ocorre erro do tipo I quando o resultado indica significância estatística mas na verdade ele aconteceu por acaso (falso positivo).

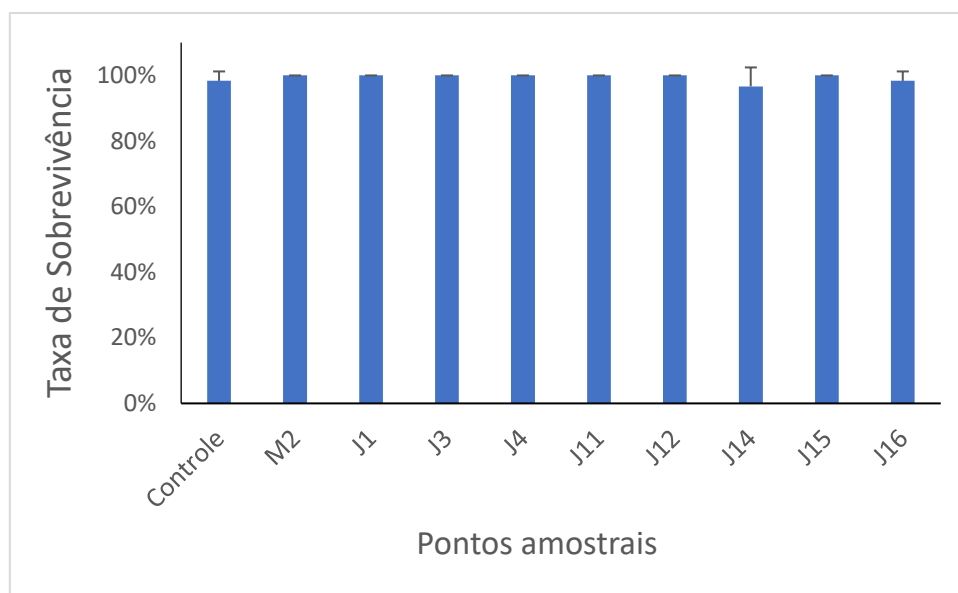


Figura 4 - Taxa de sobrevivência de *D. rerio* expostos às águas coletadas um mês após o derramamento de rejeito de minério de ferro na BRD.

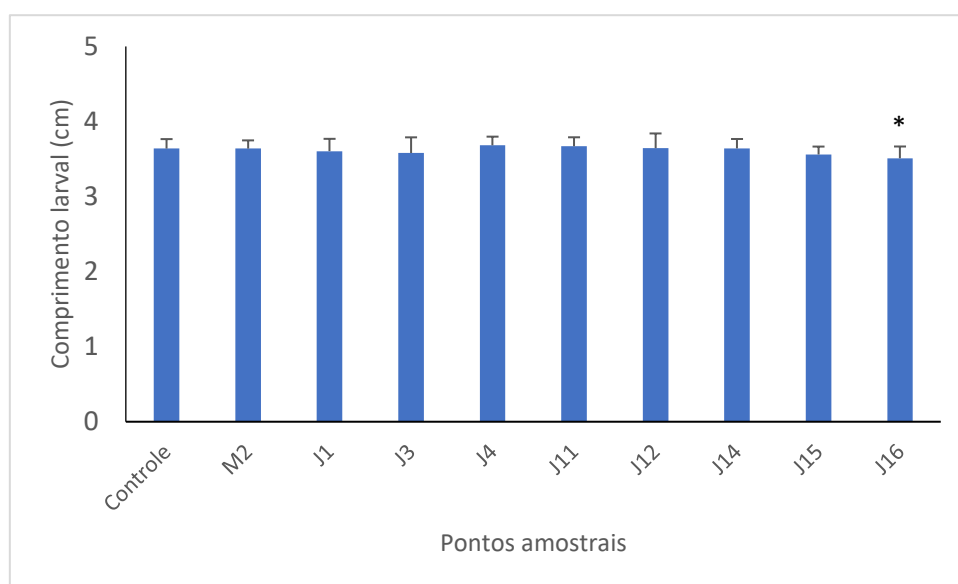


Figura 5 – Comprimento larval de *D. rerio* após 96hpf de exposição em águas coletadas na BRD em 2015

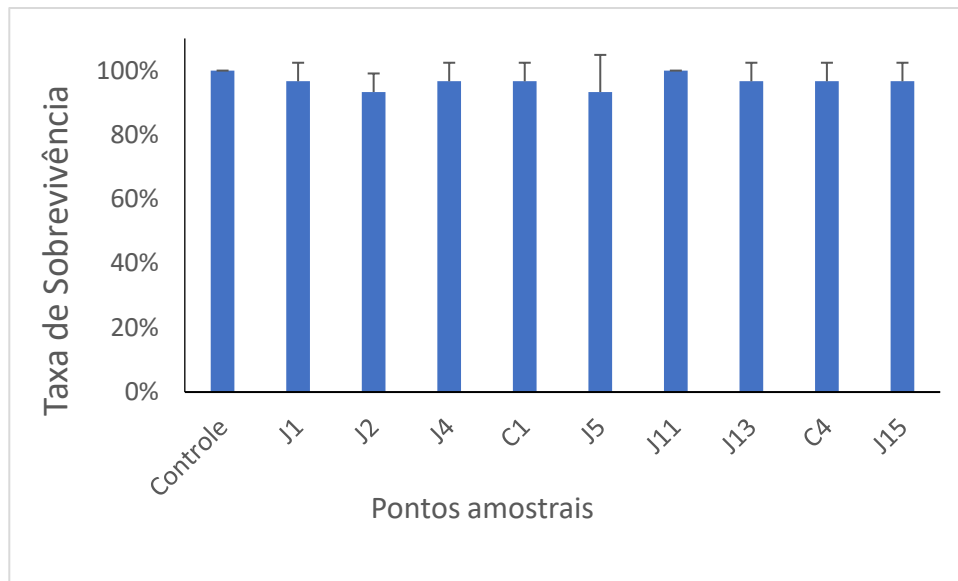


Figura 6 - Taxa de sobrevivência de *D. rerio* expostos às águas coletadas 6 meses após o derramamento de rejeito de minério de ferro na BRD.

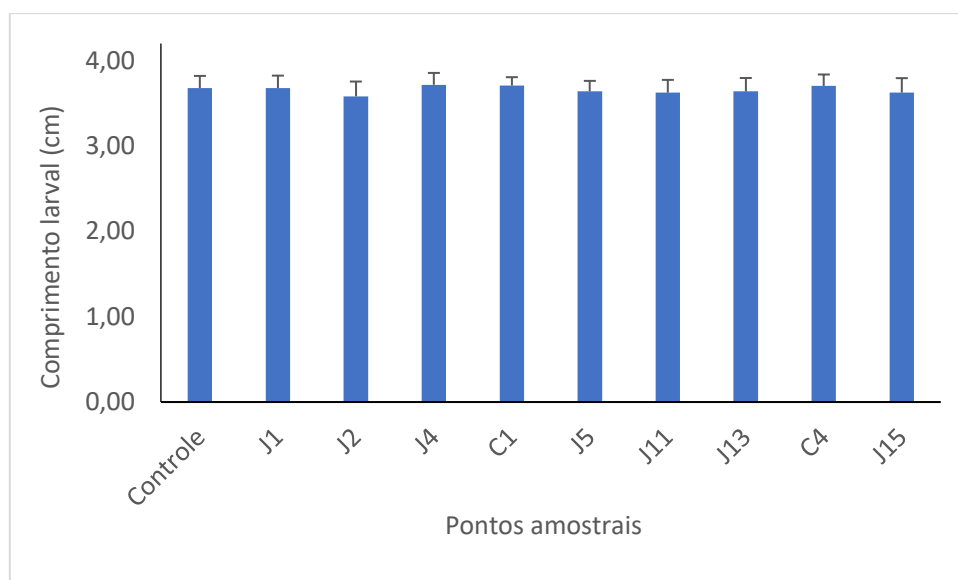


Figura 7 - Comprimento larval de *D. rerio* após 96 hpf de exposição em águas coletadas na BRD em 2016.

Discussão

Nossos resultados demonstram que os níveis de metais dissolvidos na água ao longo da bacia do rio Doce foram aumentados com a chegada da onda de rejeito de mineração, conforme discutido no capítulo 1 deste trabalho (tabela S8), com tendência à diminuição dos elementos analisados 6 meses depois, em estação seca (tabelas S8 e S9). Os dados do capítulo 1 corroboram com relatórios e laudos oficiais (IBAMA, 2015;

IGAM, 2015) quanto aos altos níveis de metais como As, Mn e Cd encontrados em águas coletadas logo após o desastre ao longo da bacia do rio Doce, e com outros trabalhos que observaram aumento dos níveis de metais logo após o desastre (Quadra et al., 2019; Macêdo et al., 2020). Da mesma forma, também foi observado por outros autores uma redução dos contaminantes metálicos nas águas analisadas ao longo do tempo (Macêdo et al., 2020; Richard et al., 2020; Vergilio et al., 2021).

Os dados de análise química relatados no capítulo 1 deste trabalho e os resultados de toxicidade aguda em embriões e larvas de *D. rerio* demonstram que apesar da concentração de alguns metais e metalóides como Mn e As excederem níveis permitidos pela legislação (água classe II) em amostras de água de ambas as campanhas, não foram observados letalidade em nenhuma das amostras testadas, havendo concordância com os dados de *Daphnia similis* e *D. magna* discutidos no capítulo 1, onde foi possível observar pouco efeito deletério nas espécies expostas.

A ausência de toxicidade observada nos resultados de exposição de zebrafish, pode ser explicada pela adsorção dos metais por partículas doadoras de oxigênio de carga negativa, como partículas sedimentares ricas hidróxidos de Fe, material particulado em suspensão e outros ligantes de carga negativa, pelos quais os metais possuem alta afinidade, o que diminui sua biodisponibilidade (Burton et al., 2019). Os metais lançados na coluna d'água de ambientes aquáticos ricos em oxidróxidos de Fe e matéria orgânica, como na bacia do rio Doce (Segura et al., 2016; Hatje et al., 2017), possivelmente apresentaram disponibilidade reduzida pela remoção dos metais dissolvidos, em decorrência dessa adsorção às partículas suspensas, seguida de processos de complexação, resultando na formação de compostos insolúveis, reduzindo a toxicidade para os organismos aquáticos (Burton et al., 2019; Huntsman et al., 2019). De fato, os rejeitos de mineração para extração do minério de Fe possuem em sua composição grandes quantidades de hematita e goetita, com altos teores de oxidróxido de Fe, o que favorece a retenção de metais em suas partículas (Passos et al., 2020).

Nossos resultados corroboram com Mendes et al. (2020), que não observaram toxicidade aguda para *D. rerio* e *D. similis* expostos às águas coletadas logo após a passagem do rejeito, porém esses autores observaram toxicidade crônica para *C. dubia* às águas coletadas dias após o rompimento, mas com queda da tendência da toxicidade para a espécie. Da mesma maneira, Almeida et al. (2021) também não observaram danos em embriões de *D. rerio* expostos a partículas de rejeitos de mineração em água, mesmo em embriões onde foi observada aderência dessas partículas na camada coriônica, resultando

no sucesso da eclosão dos ovos, sem efeitos significativos no comportamento das larvas. Vergílio et al. (2021) relataram alta taxa de sobrevivência de *D. rerio* em amostras de água coletadas 15 dias e seis meses após o impacto, apesar dos efeitos adversos observados relacionados aos metais do rejeito tanto em água quanto em material particulado.

Yamamoto et al. (2022b) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho com relação à taxa de sobrevivência de organismos expostos em elutriados de sedimentos coletados ao longo do rio Doce, após 4 anos do desastre, onde os autores demonstraram baixa ou ausência de letalidade para *Rhamdia quelen* (Jundiá), porém, alta frequência de efeitos crônicos e subcrônicos para a espécie, como deformidades e genotoxicidade, relacionados à contaminação por oligoelementos do Alto Rio Doce, danos em DNA e aumento de atividade enzimática associada ao estresse oxidativo relacionados tanto à contaminação por metais quanto à poluição por hidrocarbonetos no Médio RD, e alterações significativas dos níveis de enzimas anti-oxidantes relacionadas à ocorrência de alta concentração de HPA no rio Doce Inferior.

Já os resultados observados no comprimento larval dos organismos expostos às águas da primeira campanha deste trabalho, onde J16 apresentou diferença estatística com relação ao controle, possivelmente está relacionado ao erro estatístico *tipo I* (Neto, 1977). Existem duas hipóteses estatísticas: a hipótese nula (H_0), que supõe igualdade das médias a um nível de significância determinado previamente, podendo ser de 5%, e a hipótese alternativa (H_1), que aponta diferença significativa entre as médias comparadas (Huang & Paes, 2007; Rodrigues et al., 2017). A hipótese a ser testada é a H_0 , onde testes estatísticos examinam considerar H_1 como verdadeira, i.é., o teste estatístico verifica se a hipótese alternativa defende que H_0 é falsa ou verdadeira (Huang & Paes, 2007). O erro *tipo I* consiste na rejeição de H_0 , podendo gerar um ‘falso positivo’, onde ocorre uma probabilidade de observar diferença estatística, mesmo quando H_0 é verdadeira (Huang & Paes, 2007). Nesse trabalho, o nível de significância foi considerado de 5%, porém, a diferença estatística relacionada aos comprimentos dos organismos pode não estar associados à danos ou efeitos adversos, e sim a uma diferença marginal, mínima, visto que os outros endpoints (sobrevivência, cardiopatia, má formação e transparência) não apresentaram diferença estatística significativa com o controle evidenciando que a população não seria afetada apenas pelo comprimento levemente menor de algumas das larvas expostas.

Apesar desses achados, sabe-se que os metais podem desencadear efeitos adversos em organismos aquáticos, como aumento das ROS, danos em DNA, peroxidação lipídica e até letalidade (Gusso-Choueri et al., 2016; Simonato et al., 2016; Lunardelli et al., 2018; Weber et al., 2020). Entre alguns efeitos adversos relatados na literatura, por exposição às águas do rio Doce após o desastre, Macêdo et al. (2020) observaram danos morfológicos e alterações histológicas tanto em hepatócitos quanto em células branquiais, além de efeitos bioquímicos em peixes da espécie *Astyanax lacustre* expostos por uma semana em águas influenciadas pelo rejeito, após 37 meses do rompimento da barragem, principalmente nos organismos expostos em águas coletadas em locais mais próximos à ruptura. Passos et al. (2020) verificaram para esta mesma espécie, que após 21 dias de exposição à água coletada no estuário do RD, os organismos apresentaram efeitos neurotóxicos a partir da diminuição da atividade de AChE, relacionados aos altos níveis de Fe e Mn tanto em água quanto bioacumulados, porém os autores não observaram efeitos negativos significativos para organismos expostos aos elutriados do mesmo experimento, o que pode estar relacionado com a biodisponibilidade dos metais.

Da mesma maneira, Weber et al. (2020) demonstraram que peixes das espécies *Hoplias intermedius* e *Hypostomus affinis*, coletados em locais influenciados pelos rejeitos de mineração, apresentavam alterações celulares significativas quando comparados com organismos coletados em área controle, sem influência do rejeito, mesmo três anos após o rompimento, com histopatologias, necrose e alterações bioquímicas associadas às altas concentrações de Mn em água, em ambas as espécies.

A maioria dos estudos apontou drásticas mudanças físico-químicas e elevadas concentrações de metais nas águas, nas áreas atingidas pela lama em 2015 (Queiroz et al., 2018; IGAM 2015). Em especial, deve-se observar que nos ambientes estuarinos e marinhos, as condições geoquímicas se modificam em função da salinidade, podendo modificar a biodisponibilidade dos metais. Nesse sentido, outros trabalhos relataram queda da diversidade e alteração de comunidades aquáticas de importante valor comercial da região estuarina, impactada logo após a chegada dos rejeitos, com níveis de bioacumulação, alterações bioquímicas e histológicas em peixes estuarinos relacionados à contaminação de Fe e Mn no trecho baixo da bacia, provocando danos branquiais e hepáticos em diferentes grupos de espécies de peixes (Andrades et al., 2020; Vieira et al., 2022). Alguns autores demonstraram que, mesmo com a diminuição das concentrações de metais ao longo do tempo, a BRD ainda sofre influência da liberação milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração da Samarco, além de uma contaminação crônica

de diferentes fontes de poluição como lançamento de esgotos, escoamento de defensivos químicos de atividades agropecuárias, resíduos de atividades industriais e concentração urbana (Yamamoto et al., 2023; Souza et al., 2022), portanto, efeitos adversos podem ser causados pela combinação de poluentes de diversas fontes, o que traz sérias implicações para os processos de recuperação da bacia, que deve considerar as múltiplas fontes e seu controle.

Da mesma forma, alguns estudos realizados com amostras de água influenciadas por rejeitos de mineração similares aos liberados pela barragem de Fundão, após o rompimento da barragem do Córrego do Feijão, em Brumadinho (MG), observaram toxicidade aguda para *D. similis* e efeitos agudo e crônico para *D. rerio* (Bordon et al., 2022; Peixoto et al., 2022), com associação dos efeitos agudos em *D. rerio* à combinação de uma diversidade de substâncias tóxicas presentes no rio Paraopeba (Thompson et al., 2020).

Em contrapartida, os resultados observados neste estudo demonstraram que a exposição de *D. rerio* em águas influenciadas pelos rejeitos de mineração não causaram toxicidade aguda ou crônica para os organismos, possivelmente pela biodisponibilidade reduzida dos contaminantes analisados. Ainda assim, deve-se considerar o transporte de partículas sedimentares e matéria orgânica continental para as regiões estuarina e marinha, onde as condições físico-químicas, como salinidade e pH, podem favorecer a liberação desses contaminantes adsorvidos, e alterar sua biodisponibilidade para a biota estuarina e marinha (Sartori et al., 2023).

Conclusão

Não foram observados efeitos agudos para embriões e larvas de *D. rerio* expostos às amostras de águas coletadas ao longo do rio Doce um mês e seis meses após a liberação dos rejeitos da barragem do Fundão. Esses resultados podem estar relacionados aos compostos complexantes de metais aos oxidróxidos de Fe, ligados às partículas sedimentares, interferindo na biodisponibilidade dos contaminantes.

Referências

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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.071>

- Almeida, V. O. de, Pereira, T. C. B., Teodoro, L. de S., Escobar, M., Ordovás, C. J., dos Santos, K. B., ... Schneider, I. A. H. (2021). On the effects of iron ore tailings micro/nanoparticles in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 759, 143456. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143456>
- Andrades, R., Guabiroba, H. C., Hora, M. S. C., Martins, R. F., Rodrigues, V. L. A., Vilar, C. C., ... Joyeux, J. C. (2020). Early evidences of niche shifts in estuarine fishes following one of the world's largest mining dam disasters. *Marine Pollution Bulletin*, 154(March), 111073. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111073>
- Arndt, A., Borella, M. I., & Espósito, B. P. (2014). Toxicity of manganese metallodrugs toward *Danio rerio*. *Chemosphere*, 96, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.014>
- Bordon, I., Lima, M., Abessa, D. M. M., da Silva, P. S. C., Cotrim, M. E. B., Ulrich, J. C., ... Silva, J. R. M. C. da. (2022). The Brumadinho Mining Disaster: Immediate Impacts of Mine Tailings 5 Days after the Dam Rupture. *SSRN Electronic Journal*, 37–45. <https://doi.org/10.2139/ssrn.404754>
- Brasil, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (2005). RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005.
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., ... Seitz, N. (2005). <Altex_2_2005_87_102_Braunbeck.pdf>. *Altex*, 22(2), 87–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953964>
- Burton, G. A., Hudson, M. L., Huntsman, P., Carbonaro, R. F., Rader, K. J., Waeterschoot, H., ... Garman, E. (2019). Weight-of-Evidence Approach for Assessing Removal of Metals from the Water Column for Chronic Environmental Hazard Classification. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(9), 1839–1849. <https://doi.org/10.1002/etc.4470>
- Cavalcante, A. K., Lopes-Ferreira, M., Rogero, S. O., & Rogero, J. R. (2017). Evaluation of resveratrol toxicity in the embryolarval stage of *Danio rerio* fish. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 12(1), 133–139. <https://doi.org/10.5132/eec.2017.01.15>
- Clemow, Y. H., & Wilkie, M. P. (2015). Effects of Pb plus Cd mixtures on toxicity, and internal electrolyte and osmotic balance in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 161, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.032>
- Creaser, C. W. (1934). The Technic of Handling the Zebra Fish (*Brachydanio rerio*) for the Production of Eggs Which Are Favorable for Embryological Research and Are Available at Any Specified Time Throughout the Year. *Copeia*, 1934(4), 159. <https://doi.org/10.2307/1435845>
- Drummond, G.M. & Subirá, R.J. (2021) in Livro vermelho da biota aquática do Rio Doce ameaçada de extinção pós rompimento da barragem de Fundão: Mariana, Minas Gerais : crustáceos, efemerópteros, odonatos e peixes. Fundação Biodiversitas, 1. ed. Belo Horizonte.
- Hatje, V. (2016). On top of a mining disaster, coping with ethical issues. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(7), 1137–1138. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160190>
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143->
- Huang, G., & Paes, Â. T. (2009). Posso usar o teste t de Student quando preciso comparar três

ou mais grupos? *Por Dentro Da Estatística*, 7(2), 63–64.

- Huntsman, P., Beaudoin, R., Rader, K. J., Carbonaro, R. F., Allen Burton, G., Hudson, M., ... Waeterschoot, H. (2019). Method Development for Determining the Removal of Metals from the Water Column under Transformation/Dissolution Conditions for Chronic Hazard Classification. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(9), 2032–2042. <https://doi.org/10.1002/etc.4471>
- IBAMA. (2015). Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Laudo Técnico Preliminar, 1, 2–35. Retrieved from http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/laudo_tecnico_preliminar.pdf
- IGAM - Agência Estadual de Águas de Minas Gerais (2015). Monitoramento da qualidade das águas superficiais do Rio Doce no Estado de Minas Gerais.
- Fisk, A. T., Hobson, K. A., & Norstrom, R. J. (2001). Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environmental Science and Technology*, 35(4), 732–738. <https://doi.org/10.1021/es001459w>
- Fracácio, R. (2009). In situ and laboratory evaluation of toxicity with *Danio rerio* Buchanan (1822) and *Poecilia reticulata* Peters (1859). *Acta Limnol. Bras.*, (1822)
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., Santos, G. S., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., ... de Sousa Abessa, D. M. (2016). Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1–2), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.025>
- Lu, K., Qiao, R., An, H., & Zhang, Y. (2018). Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 202, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145>
- Lunardelli, B., Cabral, M. T., Vieira, C. E. D., Oliveira, L. F., Risso, W. E., Meletti, P. C., & Martinez, C. B. R. (2018). Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153(July 2017), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.023>
- Macêdo, A.K.S., Santos, K.P.E. dos, Brighenti, L.S., Windmöller, C.C., Barbosa, F.A. R., Ribeiro, R.I.M.A., Santos, H.B., & Thomé, R.G. (2020). Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Science of the Total Environment*, 735. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>
- Mendes, L. B., Mello, F. A., Chagas, K. R., Campelo, R. P. M., Medeiros, L. C. C., Smith, R. E. W., & Furley, T. H. (2020). Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the Fundão Dam Collapse. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 0–2. <https://doi.org/10.1002/ieam.4291>
- Neto, P. L. O. C. (1977). *Estatística*. Editora: Edgard Blücher LTDA 264p.
- OECD. (2013). GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, (July), 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Passos, L. S., Gnocchi, K. G., Pereira, T. M., Coppo, G. C., Cabral, D. S., & Gomes, L. C. (2020). Is

- the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? *Science of the Total Environment*, 736, 139644. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>
- Parra, R. R., Pereira, J. C., & Friese, K. (2007). INFLUÊNCIA ANTRÓPICA NA GEOQUÍMICA DE ÁGUA E SEDIMENTOS DO RIO CONCEIÇÃO, QUADRILÁTERO FERRÍFERO, MINAS GERAIS - BRASIL. *Geochimica Brasiliensis*, 21(1), 36–49.
- Peixoto, P. V. L., de Andrade, Í. B. L., Sales, B. C. P., & Pereira, L. C. (2022). Rupture of Brumadinho dam (Minas Gerais, Brazil): embryotoxicity in zebrafish induced by metal mixture-contaminated water. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 57(6), 479–488. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2064675>
- 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>
- Queiroz, H. M., Nóbrega, G. N., Ferreira, T. O., Almeida, L. S., Romero, T. B., Santaella, S. T., ... Otero, X. L. (2018). The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? *Science of the Total Environment*, 637–638, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>
- Queiroz, H. M., Ying, S. C., Abernathy, M., Barcellos, D., Gabriel, F. A., Otero, X. L., ... Ferreira, T. O. (2021). Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. *Environment International*, 146(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106284>
- Richard, E. da C., Estrada, G. C. D., Bechtold, J. P., de Aguiar Duarte, H., Maioli, B. G., de Freitas, A. H. A., ... Figueiredo, L. H. M. (2020). Water and Sediment Quality in the Coastal Zone Around the Mouth of Doce River After the Fundão Tailings Dam Failure. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 643–654. <https://doi.org/10.1002/ieam.430>
- Rodrigues, C. F. de S., Lima, F. J. C. de, & Barbosa, F. T. (2017). Importance of using basic statistics adequately in clinical research. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 67(6), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.bjan.2017.01.003>
- Sartori, É., dos Santos Vergilio, C., Gatts, P. V., de Oliveira, B. C. V., de Almeida, M. G., Thompson, F., & de Rezende, C. E. (2023). Trace metal concentration along the Brazilian coast: An assessment of the influence of the Doce River plume. *Marine Pollution Bulletin*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114640>
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú. L., Pedreira Filhp, W.R., Barbosa Jr, 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 (August 2016), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>
- Simonato, J. D., Mela, M., Doria, H. B., Guiloski, I. C., Randi, M. A. F., Carvalho, P. S. M., ... Martinez, C. B. R. (2016). Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 170, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>
- 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. *Science of the Total Environment*, 802, 149882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149882>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Thompson, F., de Oliveira, B. C., Cordeiro, M. C., Masi, B. P., Rangel, T. P., Paz, P., ... de Rezende, C. E. (2020). Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Science of the Total Environment*, 705, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135914>
- USEPA. (2014). Method 6020B (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, (July), 165.
- Vergilio, C. dos S., Lacerda, D., da Silva Souza, T., de Oliveira, B. C. V., Fioresi, V. S., de Souza, V. V., ... 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). *Science of the Total Environment*, 756, 143697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143697>
- Vieira, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. *MGBiota*, 2(5), 5–22. Retrieved from http://ief.mg.gov.br/images/stories/MGBIOTA/mgbiota11/mgbiot_v.2n.5.pdf#page=5
- Vieira, C. E. D., Marques, J. A., da Silva, N. G., Bevitório, L. Z., Zebal, Y. D., Maraschi, A. C., ... Sandrini, J. Z. (2022). Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. *Science of the Total Environment*, 832(March). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>
- Wang, Y., Lv, L., Yu, Y., Yang, G., Xu, Z., Wang, Q., & Cai, L. (2017). Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 170, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>
- 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(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Kim, B. S. M., ... 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 in Brief*, 45, 108715. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108715>
- Yamamoto, F.Y., Pauly, G. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Figueira, R. C. L., ... 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(November 2022), 100250. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100250>
- Yamamoto, Flávia Yoshie, Thaisa, A., Souza, C., Carvalho, V. De, Paula, S. De, Beverari, I., ... Abessa, D. S. (2022b). From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. *Science of the Total Environment*, 846(March), 157332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157332>

Anexo

Tabela S1 – Teste de sensibilidade com substância de referência 3,4 DCA (n=20).

Horas	24	48	72	96
Nº sobreviventes	20	18	11	7

Discussão geral

Esse trabalho traz uma importante avaliação química dos compartimentos do ecossistema aquático do Rio Doce e análises biológicas que envolvem organismos de diferentes níveis tróficos, com amostras coletadas ao longo de toda a bacia do rio Doce. De acordo com os dados químicos foi possível avaliar que inicialmente houve um aumento abrupto das concentrações de metais na água e nos sedimentos, e em seguida os processos hidrogeológicos presentes na bacia levaram a uma redução contínua das concentrações de metais ao longo do tempo, corroborando com outros trabalhos na região (Segura et al., 2016; IGAM, 2017; Richard et al., 2020). Embora as concentrações de metais estejam próximas ou similares às aquelas encontradas antes do desastre, tais níveis ainda indicam certo enriquecimento para aqueles elementos relacionados com a contaminação histórica causada pela mineração na região. Também se observou uma notável predominância de teor de grãos finos logo após o desastre, seguido de recuperação gradual das características granulométricas do rio (Gomes et al., 2017), com os sedimentos retornando a uma textura arenosa alguns anos depois da passagem dos resíduos de Fundão. Isso sugere que os materiais mais finos, e consequentemente com maiores níveis de metais associados, vêm sendo transportados para o mar.

De forma geral, a disponibilidade dos metais apresentou-se reduzida, tendo sido observada toxicidade baixa ou ausente para os organismos testados. Esta biodisponibilidade de metais no Rio Doce foi influenciada pelas características ambientais, que envolvem adsorção dos elementos em partículas ricas em oxihidróxido de Fe, e consequentemente levando a uma baixa bioacumulação e consequentemente poucos efeitos nos organismos testados, incluindo-se poucas alterações bioquímicas em bivalves escavadores. Resultados similares aos nossos foram também relatados por outros autores (Segura et al., 2016; Vieira et al., 2022). Porém, como a literatura indica efeitos ecotoxicológicos para algumas espécies avaliadas, fica evidenciado que é possível que os níveis de contaminação no Rio Doce possam afetar as espécies mais sensíveis, seja devido aos resíduos liberados pelo desastre, seja por outras fontes de contaminação.

Nesse sentido, observa-se que, ao menos do ponto de vista ecotoxicológico, os impactos causados pelo rompimento da barragem de Fundão vêm sendo atenuados, havendo redução dos níveis de contaminação por metais, e poucos efeitos tóxicos associados. No entanto, é sabido que houve impactos em outras dimensões, como nos ambientes terrestres, na paisagem e geografia local, nas atividades econômicas, na saúde

física e mental das populações ribeirinhas, entre outros, os quais podem ser tão ou mais graves do que os impactos ecotoxicológicos medidos no ambiente aquático, os quais também devem ser considerados, avaliados, para uma análise mais profunda dos impactos gerados por este evento, numa dimensão mais abrangente.

Os próximos estudos também devem focar em analisar e estudar as contribuições dos tributários e de outras fontes, como contribuições urbanas e agrícolas e efluentes industriais, as quais podem introduzir contaminantes no ambiente aquático do Rio Doce. É importante que estas fontes sejam caracterizadas quanto aos contaminantes orgânicos e inorgânicos, assim como as respostas biológicas frente à soma de substâncias introduzidas pelo conjunto de fontes.

Nesse sentido, passa a ser fundamental definir critérios para a recuperação da bacia, principalmente em termos de metas desejáveis para as concentrações ambientais das substâncias químicas, assim como a adoção de abordagens para uma gestão de toda a bacia hidrográfica, não focada apenas a um evento, mas sim a toda sua complexidade, que inclui também a diversidade de fontes de impacto, os usos da água, os aspectos ecológicos e da biodiversidade, as demandas das populações, entre outros fatores.

É necessário que os estudos considerem impactos imediatos após o acidente podendo estudar vários pontos ao longo da bacia e não apenas um trecho. Em especial, as regiões estuarinas e costeiras, que recebem partículas sedimentares fluviais enriquecidas de metais constantemente (Queiroz, et al., 2021; Sartori et al., 2023), necessitam de uma maior atenção, já que os processos de depuração natural da bacia acabam por transportar os contaminantes para os ambientes marinhos, onde as condições geoquímicas são distintas dos ambientes dulciaquícolas. Dessa forma, as condições físico-químicas singulares desses locais podem favorecer a liberação dos contaminantes, tornando-os biodisponíveis (Sartori et al., 2023), podendo levar a efeitos negativos aos organismos. Ademais, é necessária responsabilização não só das empresas envolvidas em atividades extrativistas na adoção de práticas mais seguras, mas as demais atividades poluidoras instaladas na BRD, e que as leis e o poder público sejam mais rigorosos na fiscalização e controle (Milanez et al., 2021). Assim, espera-se que o presente estudo contribua com informações para subsidiar as ações de gestão e recuperação da Bacia do Rio Doce.

Referências

IGAM. (2017). Encarte Especial Sobre a Qualidade Das Águas Do Rio Doce Após 2 Anos Do Rompimento De Barragem De Fundão -2015/2017, 2. Retrieved from

<http://www3.ana.gov.br/porta1/ANA/sala-de-situacao/rio-doce/documentos-relacionados/encarte-qualidade-da-gua-do-rio-doce-dois-anos-apos-rompimento-de-barragem-de-fundao-1.pdf>

- Gomes, L. E. de O., Correa, L. B., Sá, F., Neto, R. R., & Bernardino, A. F. (2017). The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1–2), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.056>
- Milanez, B., Ali, S. H., & Puppim de Oliveira, J. A. (2021). Mapping industrial disaster recovery: Lessons from mining dam failures in Brazil. *Extractive Industries and Society*, 8(2), 100900. <https://doi.org/10.1016/j.exis.2021.100900>
- Queiroz, Hermano M., Ying, S. C., Bernardino, A. F., Barcellos, D., Nóbrega, G. N., Otero, X. L., & Ferreira, T. O. (2021). Role of Fe dynamic in release of metals at Rio Doce estuary: Unfolding of a mining disaster. *Marine Pollution Bulletin*, 166(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112267>
- Richard, E.C., de Aguiar Duarte, H., Calderucio Duque Estrada, G., Bechtold, J. P., Gusso Maioli, B., Araujo de Freitas, A. H., Melges Figueiredo, L. H. (2020). Influence of Fundão Tailings Dam Breach on Water Quality in the Doce River Watershed. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 583–595. <https://doi.org/10.1002/ieam.4311>
- Sartori, É., dos Santos Vergilio, C., Gatts, P. V., de Oliveira, B. C. V., de Almeida, M. G., Thompson, F., & de Rezende, C. E. (2023). Trace metal concentration along the Brazilian coast: An assessment of the influence of the Doce River plume. *Marine Pollution Bulletin*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114640>
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú. L., Pedreira Filhp, W.R., Barbosa Jr, 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 (August 2016), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>
- Vieira, C. E. D., Marques, J. A., da Silva, N. G., Bevitório, L. Z., Zebral, Y. D., Maraschi, A. C., ... Sandrini, J. Z. (2022). Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. *Science of the Total Environment*, 832(March). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Além das medições convencionais: avaliação de efeitos tóxicos em *Danio rerio* e *Corbicula fluminea* associados a águas e sedimentos contaminados por rejeitos de mineração liberados após o acidente com a Barragem de Fundão no Rio Doce (ES-MG)", Protocolo nº **02/2022-CEUA**, sobre a responsabilidade do **Dr. Denis Moledo de Souza Abessa** e sua orientada **Guacira de Figueiredo Eufrasio Pauly**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA, do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista, em reunião de 28/10/2022.

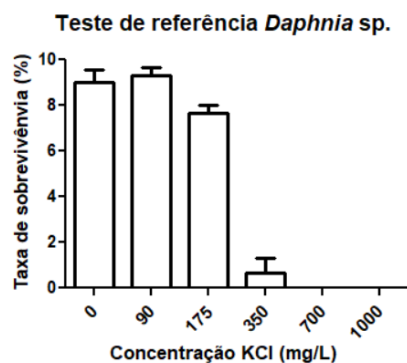
Vigência do Projeto:	12/03/2018 a 17/03/2023
Espécie/linhagem:	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)
Número de animais:	30 animais (20 machos e 10 fêmeas)
Peso/Idade:	Aproximadamente 2g / Indeterminado
Sexo:	Machos e Fêmeas
Origem:	Laboratório Nacional de Nanotecnologia do Polo II de Alta Tecnologia de Campinas (LNNano-CNPq)

São Vicente, 04 de novembro de 2022


Profa. Dra. Alessandra da Silva Augusto
Coordenadora – CEUA

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil
Tel. (13) 3569-7100 - Fax (13) 3569-7146 – itaeps.clp@unesp.br

Ensaio com substância de referência em *Daphnia* sp. KCl (mg/L) – Capítulo 1



LC50 229,20 mg/L (95% C.I.: 198,2 – 260,2)

Ensaio com substância de referência em *Daphnia* sp. KCl (mg/L) – Capítulo 1

	17/08/2017	14/09/2017	19/10/2017	16/11/2017	08/12/2017
EC50 (mg/l)	387,92	352,78	360	281,44	360
	18/01/2018	09/02/2018	08/03/2018	20/04/2018	24/05/2018
EC50 (mg/l)	352,78	334,09	339,74	360	276,59
	21/06/2018	28/07/2018	19/08/2018	20/09/2018	25/10/2018
EC50 (mg/l)	322,77	310,49	272,16	350,76	311,4
	29/11/2018	18/04/2019	16/05/2019	27/06/2019	18/07/2019
EC50 (mg/l)	424,81	287,39	311,36	318,77	278,29
Média (mg/L)	329,68	DP	Limite Inferior	Limite superior	Coefficiente de variação (%)
		40,34	249	410,36	12

Parâmetros físico-químicos ensaios *Daphnia* sp. - Capítulo 1

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos do teste de toxicidade com *Daphnia* sp. em amostras de água coletadas ao longo do Rio Doce na 1ª campanha.

Ponto Amostral	pH	Eh (mV)	OD (mg/L)
M2	7,44	170	7,5
J1	6,28	201	6,7
J2	7,80	152	6,9
J3	6,90	198	7,6
J4	7,37	179	7,5
J5	6,84	202	7,5
J10	6,79	198	7,8
J11	7,05	194	7,6
J12	7,15	190	7,4
J13	7,43	169	7,5
J14	7,11	193	7,6
J15	7,42	175	7,7
J16	7,28	181	7,8
J17	7,11	186	7,5

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do teste de toxicidade com *Daphnia* sp. em amostras de água coletadas ao longo do Rio Doce na 2ª campanha.

Ponto amostral	pH	Eh (mV)	OD (mg/L)
M2	7,31	181	7,6
J1	6,50	229	7,3
J2	7,72	179	7,4
J3	7,22	210	7,7
J4	7,03	199	7,6
J5	6,90	216	7,7
J10	6,99	190	7,8
J11	7,32	201	7,6
J12	7,38	195	7,7
J13	7,12	197	7,6
J14	7,19	194	7,7
J15	7,57	211	7,9
J16	7,21	207	7,7
J17	7,07	212	7,6
Controle	7,55	180	7,7

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos do teste de toxicidade com *Daphnia* sp. em amostras de água coletadas ao longo do Rio Doce na 4ª campanha.

Ponto amostral	pH	OD (mg/L)
J2	7,27	6,58
J4	7,55	5,76
J11	7,5	5,41
J12	7,45	5,94
REF	7,81	5,64
J14	7,98	5,63
J15	7,86	5,95
J16	7,91	5,22
Controle	7,87	7,72

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos do teste de toxicidade com *Daphnia* sp. em amostras de água coletadas ao longo do Rio Doce na 5ª campanha.

Ponto amostral	pH	OD (mg/L)
J2	7,06	7,09
J4	8,18	7,49
REF	4,5	7,35
Controle	8,42	7,44

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos do teste de toxicidade (ISA) com *Daphnia* sp. em amostras de sedimentos coletados ao longo do Rio Doce na 4ª campanha.

Ponto amostral	pH	OD (mg/L)
J4	8,16	6,81
J11	7,75	6,18
J12	7,45	5,94
REF	8,09	6,49
Controle	7,87	7,72

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do teste de toxicidade (ISA) com *Daphnia* sp. em amostras de sedimentos coletados ao longo do Rio Doce na 5ª campanha.

Ponto amostral	pH	OD (mg/L)
J4	8,28	6,53
J11	7,77	6,30
J14	7,73	7,70
J15	7,86	6,62
J16	8,14	6,31
REF	7,35	6,06
Controle	7,87	7,72