

UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Biomarcadores bioquímicos de exposição em *Corbicula fluminea*
expostos a sedimentos contaminados do rio Doce após o rompimento
da Barragem do Fundão – Mariana/MG

Thaís Ralha Rodrigues

São Vicente
2022

Thaís Ralha Rodrigues

Biomarcadores bioquímicos de exposição em *Corbicula flumínea*
expostos a sedimentos contaminados do rio Doce após o rompimento
da Barragem do Fundão – Mariana/MG

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus do
Litoral Paulista para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas, com habilitação em
Gerenciamento Costeiro.

Orientadora: Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly
Co-Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

São Vicente

2022

R696b

Rodrigues, Thaisa Ralha

Biomarcadores bioquímicos de exposição em *Corbicula fluminea* expostos a sedimentos contaminados do rio Doce após o rompimento da Barragem do Fundão – Mariana/MG / Thaisa Ralha Rodrigues. -- São Vicente, 2022

46 f. : tabs., fotos, mapas

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

Orientadora: Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly

Coorientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Toxicologia. 2. Marcadores bioquímicos. 3. Glutathione. 4. Metais. 5.
Bivalve. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à UNESP, em especial ao IB/CLP, por todo o conhecimento adquirido na formação, pelas oportunidades e por tudo o que realizaram para que minha formação em Gerenciamento Costeiro tivesse o menor prejuízo possível devido à pandemia de COVID-19. Agradeço também ao apoio e financiamento concedido pela Capes através da bolsa PIBIC para a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente aos meus pais pelo suporte em todos os momentos difíceis que passei durante esses últimos 2 anos, assim como por sempre respeitarem e apoiarem minhas decisões tanto acadêmicas quanto em demais aspectos da minha vida. Da mesma forma quero agradecer por todo o amor e carinho proporcionado à mim pelos meus animais de estimação (membros da minha família e melhores amigos que uma pessoa poderia querer) Sophie, Nina e Ryan.

Agradeço a todos os amigos e demais familiares que também se mantiveram sempre por perto, seja aqueles mais antigos, em especial Letícia Severo e Raphael Cunha, assim como aqueles mais recentes que a vida me proporcionou ou me aproximou e eu só tenho à agradecer por se tornarem pessoas tão especiais e importantes pra mim. Desses amigos mais recentes maravilhosos, resalto aqui minha querida Turma XV, em especial minhas amigas Vitória Isabela (Murta), Melissa Batista (Yaoi), Joana Lima (Naza), Cássia Alves (Speed) e Sarah que sempre vou guardar no coração e espero rever um dia, mas sei que atualmente já estão seguindo seus respectivos sonhos e espero de coração que os realizem. Também agradeço em especial ao Murilo Vieira (Konga, eterno casal 2016), quem mais passaria a vergonha do vídeo de espécie exótica x nativa comigo? Hahahaha.

Lógico que gostaria de agradecer particularmente à Vitória Isabela, Murtinhaaa, não apenas pela companhia e toda a ajuda durante esses anos, como também por ser essa menina incrível, responsável e determinada que tanto admiro, torço para que só tenha o que ganhar na vida e agradeço imensamente à Deus por ter me permitido conhece-la e me tornar sua amiga.

Agora fora da universidade, agradeço aos meus amigos Pedro Henrique Duarte e Alan Santos pela companhia e conselhos durante esses dois anos que acabaram nos reaproximando desde a época do colégio. Agradeço também à pessoas que conheci mais recentemente, porém das quais gosto muito e são importantes para mim, além de sempre estarem ao meu lado quando precisei, fizeram dos meus dias e momentos ruins mais felizes, quero que saibam que sempre que precisarem estarei disposta a ajudar. Na música, agradeço principalmente ao meu antigo professor de guitarra e amigo Mike Hutterer pela pessoa atenciosa que sempre foi, por carinho que tem por mim e por sempre se importar comigo, saiba que te considero e gosto de você como parte da minha família, talvez um tio hahahaha e te admiro como guitarrista.

Agradeço também à todos os pesquisadores e pesquisadoras do laboratório NEPEA, por toda a paciência e ajuda durante todo o trabalho, além do aprendizado que sempre vou adquirindo quanto mais tempo passo ao lado de vocês. Por fim agradeço a minha orientadora Guacira Eufrásio por ter sido além de uma orientadora, uma amiga, que esteve sempre paciente e preocupada com a minha aprendizagem. Agradeço por compartilhar comigo esses momentos durante esse TCC. Agradeço também ao meu co-orientador Denis Moledo de Souza Abessa pela ajuda durante essa pesquisa, por todo o apoio concedido e conhecimentos passados durante esse trabalho.

Resumo: A Bacia Hidrográfica do Rio Doce dispõe de uma área de drenagem de 86.715 km², abrangendo os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, e tem o Rio Doce como o principal corpo d'água da bacia, com 850 km de extensão. Diversos impactos ambientais historicamente se fizeram presentes ao longo da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, devido às atividades econômicas na região, principalmente pelas atividades de mineração. Em 05 de Novembro de 2015 a barragem do Fundão, pertencente a mineradora Samarco rompeu-se, liberando milhões de m³ de rejeitos de mineração, causando um dos maiores desastres ambientais da história do Brasil. Os efeitos da poluição ambiental na biota causados pelo rompimento da barragem, podem ser avaliados a partir da utilização de biomarcadores, indicadores sensíveis aos efeitos da exposição aos metais, e que mostram as respostas biológicas dos organismos a um agente tóxico no ambiente. O objetivo deste trabalho foi determinar se a espécie de bivalve *Corbicula fluminea* exibiu mudanças metabólicas quando expostos à amostras sedimentares do Rio Doce com diferença temporal e espacial entre estes. Foram realizadas análises químicas por Plasma por Acoplamento Indutivo (ICP) para quantificar os metais em cada ponto analisado. Os moluscos bivalves da espécie *Corbicula fluminea* foram coletados no Rio Ribeira de Iguape e levados ao Laboratório para aclimação (72h) e exposição aos sedimentos. Foram então realizados os ensaios de exposição destes animais à sedimentos coletados ao longo da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (BHRD), após o rompimento da barragem do Fundão (amostras coletadas em dezembro de 2015, novembro de 2016, Janeiro de 2019 e Julho/Agosto de 2019), analisando ao final dos 14 dias de exposição os biomarcadores Glutaciona reduzida (GSH), Glutaciona-S-Transferase (GST) e Glutaciona Peroxidase (GPx) por leitura de absorvância em espectrofotometria de acordo com os respectivos protocolos. As coletas do sedimento foram realizadas em pontos escolhidos de acordo com as regiões afetadas pelos rejeitos. Por fim as atividades destes biomarcadores foram analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) para os resultados paramétricos e Kruskal-Wallis para não paramétricos, com posteriori de Dunn, além da realização de correlação linear de Pearson entre as variáveis metais e biomarcadores. Os resultados químicos mostraram um aumento da concentração de metais com o tempo, apresentando também maior frequência de pontos acima da legislação (CONAMA 454/2012) para Arsênio, Cádmio e Níquel, possivelmente devido a natureza lamosa da pluma e das mudanças de fluxo de água do rio ao longo do ano. Os biomarcadores apresentaram ter suas atividades diminuídas pela alta concentração dos metais, demonstrando a influência destes nesses biomarcadores, também mostraram a possibilidade de haver outros contaminantes envolvidos no comportamento dos mesmos, como orgânicos e metais não analisados no trabalho, também demonstrando uma possível participação de demais vias metabólicas nas campanhas mais recentes (3 e 4), como a metalotioneína e peroxirredoxina, levando a diminuição destes biomarcadores. Além disso, foi visto pelas análises químicas a mistura ambiental complexa de metais. Por fim, o presente trabalho foi capaz reafirmar que os bivalves *C. fluminea* são bons modelos para análise de biomarcadores, também foi possível notar a necessidade de um contínuo biomonitoramento ao longo do Rio Doce. A continuidade desta pesquisa, onde haverá uma análise com demais informações, além de outros biomarcadores, será capaz de fornecer uma melhor visão da dispersão de contaminação ao longo da Bacia Hidrográfica do Rio Doce.

Palavras-chave: Glutaciona; bivalve; metais; contaminação

Abstract: The Doce river basin has 86.715 km² of drainage area that covers both Minas Gerais and Espírito Santo states, been the Doce river it's mainly water body with an extension of 850 km. The regional economic activities result in several historical environmental impacts in the Doce river hydrographic basin, especially the mining activity. The Fundão dam belonging to the mining company Samarco collapsed in November 05, 2015, causing one of the biggest environmental disasters in Brazil history. The use of biomarkers can evaluate the environmental pollution caused by the dam collapse on the biota, because biomarkers are sensitive indicators that displays the organism biological response to an environmental toxic agent. This study aimed to determine if the bivalve species *Corbicula fluminea* exhibited metabolic changes when exposed to temporal and spatial distinct Doce river sedimentary samples. To quantify the metals in each sedimentary sample, the chemical analysis was performed by Inductively Coupled Plasma mass spectrometry (ICP). The bivalve mollusks *C. fluminea* were collected in Ribeira de Iguape river and carried to laboratorial acclimatization (72h) and sedimentary exposition. Those animals were used on exposition tests to sedimentary samples of multiple Doce river hydrographic basin (BHRD) sites after the Fundão dam collapse (samples collected at December 2015, November 2016, January 2019 and July/August 2019). Then after the 14 days of exposition the biomarker reduced glutathione (GSH), Glutathione-S-Transferase (GST) and Glutathione peroxidase (GPx) were analyzed by absorbance in spectrophotometry in accordance to protocol. The sample sites were chosen in accord with regions affected by tailings. The biomarkers activities were statistically quantified by Variance Analysis (ANOVA) for the parametric results and Kruskal-Wallis for non-parametric ones with Dunn's posteriori. The Pearson linear correlation was made as well for analyze the relation between metals and biomarkers. The chemical results showed a temporal metal concentration increase with and a greater frequency of sites above CONAMA 454/2012 regulation for As, Cd and Ni probably as result of the plume mud condition and river flow changes throughout the year. The biomarkers showed activities reduction by the high concentration of metals, demonstrating the influence of the metals in these biomarkers. The analyses showed as well the possibility of other contaminants involved in this pattern, such as organics and metals not analyzed in the work. Also, the decrease of biomarkers showed the possibility of others metabolic pathways participation in the most recent campaigns collection (3 and 4), such as metallothionein and peroxiredoxin. In addition, the chemical analysis managed to exhibit the complex environmental mixture of metals. Finally, the present study was able to confirm that *C. fluminea* are great models for biomarkers analysis. The data obtained suggests a need of a continuous biomonitoring along the Doce river. The continuity of this research with other information analysis and biomarkers will be able to provide a better understanding of the contamination dispersion along the Doce River Hydrographic Basin.

Key-words: Glutathione; bivalve; metals; contamination

Sumário

1. Introdução	7
2. Objetivo.....	12
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Área de Estudo.....	12
3.2. Coletas	13
3.3. Organismo-teste	16
3.4. Amostragem.....	16
3.5. Análises Químicas	16
3.6 Ensaio de exposição	17
3.7 Biomarcadores.....	19
3.8 Análises Estatísticas.....	20
4. Resultados e Discussão	20
4.1 Análises Químicas	20
4.2 Parâmetros Físico-Químicos	24
4.3 Análise dos Biomarcadores	24
5. Conclusão.....	35
6. Referências Bibliográficas	36
ANEXO I	42
Teste de Normalidade Shapiro-Wilk	42
ANEXO II.....	44
Coordenadas Geográficas (UTM) dos pontos de coleta.	44
ANEXO III.....	45
Tabela de valores de O ₂ e pH.....	45
ANEXO VI	46
Metais/Biomarcadores nas amostras sedimentares:.....	46

1. Introdução

A Bacia Hidrográfica do Rio Doce ocupa uma área de drenagem de 86.715 km², abrangendo os estados de Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES), estando em sua maior parte (86%) inserida dentro do estado de MG. O Rio Doce (RD) é um corpo d'água com extensão de 850 km desde sua nascente até desaguar no Oceano Atlântico, na altura da praia da Regência, no município de Linhares (ES). Ao longo do seu percurso, possui diversos importantes afluentes como os rios Carmo, Santo Antônio, Santa Maria do Rio Doce e Piracicaba (Consórcio Ecoplan Lume, 2010).

Historicamente, a bacia hidrográfica do Rio Doce 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. Atividades industriais importantes encontram-se instaladas na região, como o complexo siderúrgico da Usiminas e a companhia de mineração Samarco Mineração S.A. que pertence a duas outras grandes corporações, a Vale do Rio Doce S.A. e a anglo-australiana BHP Billiton (Consórcio Ecoplan Lume, 2010; Espindola et al., 2019).

Outro grande problema enfrentado pelos cursos d'água da Bacia do Rio Doce é o desmatamento intensivo e o mau uso do solo, principalmente pelas atividades agropecuárias, que favorecem a exposição do solo e a erosão, provocando o assoreamento dos leitos dos rios e contaminação com insumos agrícolas e pesticidas (Fundação Renova, 2019).

Porém a situação do Rio Doce se agravou a partir do dia 05 de novembro de 2015, quando a barragem de Fundão, construída para abrigar os resíduos de mineração de ferro pertencente à empresa Samarco, rompeu-se, causando um dos maiores desastres ambientais da história do Brasil. Cerca de 55 à 62 milhões de m³ de rejeitos da mineração foram liberados no rio Gualaxo do Norte e seguiram o curso do rio atingindo os rios do Carmo e Doce. O colapso da barragem resultou na morte de 19 pessoas, na destruição do distrito de Bento Rodrigues, o qual foi soterrado pelos rejeitos, deixando sua população desabrigada, além dos diversos impactos ambientais nos ecossistemas associados aos rios afetados e ao ambiente marinho (Miranda & Marques, 2016; Lopes, 2016).

Os sedimentos contaminados alcançaram o estuário do rio Doce, na cidade de Linhares, e o Oceano Atlântico, onde as correntes oceânicas permitiram que os sedimentos se espalhassem 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 tendo impactado até mesmo os recifes de corais de Abrolhos, o que possivelmente levou até mesmo à diminuição do crescimento dos corais da espécie *Montastraea cavernosa*. (Fernandes et al., 2016; Mazzei et al., 2017; Miranda & Marques, 2016; Cardoso et al., 2022).

Ainda dentro da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, o laudo técnico preliminar realizado pelo IBAMA (2015) apontou que, a partir de estudos de necropsias e considerando apenas a organismos mortos na superfície da água, diversas espécies de peixes e crustáceos encontravam-se no seu período de reprodução, dando um exemplo de como a perda dos organismos aquáticos e da biodiversidade regional pode ter sido inestimável, e que o dano ecossistêmico foi possivelmente muito maior do que se tem informações (IBAMA, 2015).

Mesmo que alguns metais sejam essenciais para diversas funções biológicas, em altas concentrações podem se tornar perigosos para os organismos. Conforme relatório do programa de monitoramento da RENOVA, realizado em 2019, os níveis de ferro dissolvido e manganês total analisados de amostras de água coletados entre 2017 e 2018 (Fundação RENOVA, 2019), estiveram acima dos limites de referência do CONAMA 357/2005 para água doce classe 2 e salobra classe 1, em alguns pontos do Rio Doce, do Carmo e Gualaxo do Norte.

Ainda segundo dados recentes do IGAM (2020), mesmo que 2016 tenha sido considerado o ano com maior impacto na qualidade da água ao longo do Rio Doce, em 2020, durante o período chuvoso houve uma piora em parâmetros como ferro e alumínio dissolvido, manganês total e turbidez por conta da possível presença de rejeitos ao longo da calha do rio Doce, que nesses períodos são levados para a coluna d'água levando ao aumento da contaminação, principalmente ao se considerar a influência de atividades antrópicas tanto na própria dinâmica do rio, como o desmatamento ou até mesmo nos eventos meteorológicos que determinam tal dinâmica de fluxo, como o aumento na magnitude de fenômenos de alta-escala do aumento em fluxo do rio, como a Zona de Convergência do Atlântico Sul e diminuição daqueles responsáveis aos períodos de seca (Oliveira et al., 2017).

De modo geral, muitos metais são importantes para a vida (i.e. metabolismo dos organismos), como o caso do cobre, que é necessário para diversas enzimas relacionadas com crescimento, desenvolvimento e manutenção dos organismos (Silva, 2010). Quando em altas concentrações no ambiente os metais podem se tornar uma ameaça à vida aquática. No entanto, outros elementos, como o Hg, Pb e o As, não possuem função biológica e podem ser tóxicos em baixas concentrações. Os elementos metálicos podem advir de diversas fontes antropogênicas como mineração, esgotos, efluentes industriais, embarcações e agricultura, acarretando concentrações anormais ao ambiente, como chumbo e mercúrio (Zhang et al., 2010). Os metais, quando presentes no ambiente, podem ser bioacumulados pela biota, e alguns podem inclusive biomagnificar (Marengoni et al., 2013), como é o caso do Hg.

A exposição aos metais pode causar diversos danos aos organismos, por variadas vias metabólicas. Uma dessas vias envolve o sistema antioxidante, pois sabe-se que variadas enzimas antioxidantes são sensíveis à exposição aos metais, pois estes conseguem interagir diretamente com os grupos funcionais ou até mesmo substituir o co-fator essencial para o funcionamento destas enzimas (Zhang et al., 2010). Tal processo e pode ser exemplificado por trabalhos como o de Farombi et al

(2007), o qual analisou as consequências da exposição dos peixes do rio Ogun à diversos metais pesados, tendo detectado alterações no ciclo redox da glutatona dentre os impactos resultantes (Barbosa et al., 2010).

É também amplamente conhecido que os metais possuem a capacidade de produzir Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), moléculas formadas tanto por fontes endógenas (como falhas mitocondriais na cadeia transportadora de elétrons) quanto por fontes exógenas (como solventes industriais e pesticidas). A denominação Espécies Reativas de Oxigênio vem do fato de que essas possuem o desemparelhamento de elétrons na última camada, ou seja, um elétron desta camada torna-se livre, o que leva as ERO à serem altamente instáveis, reativas e de meia-vida curta. Mesmo que também possam ser chamadas de radicais livres, sabe-se que existem espécies reativas não radicalares, destacando-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conhecido por seu potencial citotóxico (Gouveia e Lima, 2017).

As ERO ocorrem naturalmente nos organismos, possuindo até mesmo papéis essenciais em reações relacionadas à inflamação e também agindo em muitas funções como um segundo mensageiro, sendo controladas por um sistema complexo de moléculas enzimáticas e não enzimáticas, os antioxidantes. Porém quando há o desequilíbrio deste sistema redox, pelo aumento das espécies reativas no organismo ou pela perda da função das enzimas antioxidantes, ocorre o processo de estresse oxidativo, o qual é muito danoso à célula e ao organismo, pois inclui lesões que vão desde a oxidação de estruturas celulares até mesmo a danos no DNA e formação de células cancerígenas (Rover et al., 2001; Burton & Jauniaux, 2010).

Estudos vêm sendo realizados com diversas espécies de moluscos bivalves mostrando os danos que podem ser observados nestes animais devido a exposição aos metais. Além disso, como esses organismos são importante elo da cadeia alimentar de muitos ambientes aquáticos, sua contaminação pode causar a transferência trófica dos contaminantes (Marengoni et al., 2013), também resultando em danos como os descritos acima. Camargo (2018) realizou experimentos com filtradores do litoral de São Paulo e observou efeitos genotóxicos, peroxidativos e inibição de importantes enzimas antioxidantes, neste caso pela baixa atividade das enzimas colinesterases, que responderam a metais como cromo e cádmio.

Já Spann et al. (2011) realizaram experimentos laboratoriais de toxicidade com indivíduos de diversos tamanhos da espécie *Corbicula fluminea*, para observar se havia relação de dependência entre o tamanho dos animais e efeitos metabólicos da exposição ao zinco e cádmio e foi concluído que o tamanho dos animais influencia em suas respostas metabólicas relacionadas ao estresse, assim como, observou-se que concentrações baixas, porém relevantes, destes elementos no sedimento levaram a alterações no metabolismo energético e perturbações nos aminoácidos. A escolha dos moluscos bivalves para a realização de estudos ecotoxicológicos e monitoramentos ambientais se justifica pelo fato desses

organismos serem importantes filtradores sésseis, pois se alimentam do material em suspensão na coluna d'água sem sair do local onde assentam, sendo ótimos bioindicadores de poluição do ambiente aquático, pois ao se alimentarem, acumulam diversos contaminantes em seus tecidos, como glândula digestiva e brânquias. Além disso, são frequentemente muito abundantes nos ambientes aquáticos (Marengoni et al., 2013; Zuykov et al., 2013).

A Ecotoxicologia aparece como uma forma de se analisar os impactos causados pela poluição ambiental, pois é o ramo da ciência dedicado a avaliar as respostas dos organismos a um agente químico no ambiente desde níveis de organização biológica mais baixos, como moleculares, até os níveis mais altos como comunidades e ecossistemas (Rand, 1995).

Dentro das diversas ferramentas existentes na ecotoxicologia, os biomarcadores são indicadores sensíveis aos efeitos de estressores biológicos, químicos ou físicos (Jain, 2010), sendo capazes de apontar o grau de exposição do indivíduo ao agente tóxico. Além disso, alguns biomarcadores podem mensurar também o efeito tóxico nos organismos expostos podendo diferenciar o estresse natural do induzido por efeitos tóxicos de poluentes (Pina et al., 2007; Walker, 1995). Nesse sentido, têm sido muito utilizados na área de biomonitoramento ambiental, principalmente aplicados aos metais (Santonen, 2015).

De acordo com trabalhos como de Sogorb (2014), VAN DER OOST (2003), WHO (1993) e Santonen (2015), os biomarcadores são categorizadas em 3 grupos:

De exposição: Sempre se refere à indicação de que o organismo de estudo foi exposto à algum tipo de xenobiótico, normalmente através da mensuração do produto da interação entre o poluente e a célula-alvo.

De efeito: São alterações nos tecidos, metabolismo ou reações fisiológicas de um indivíduo que podem ter relação com um possível ou já estabelecido efeito adverso (ou doença), quando há prejuízos para a saúde do organismo.

De susceptibilidade: Fatores genéticos e mudanças em receptores são exemplos desse tipo de biomarcador, mostrando a capacidade própria ou adquirida de um indivíduo a responder quando exposto a uma substância xenobiótica específica.

Há pesquisadores que consideram as mudanças comportamentais como biomarcadores, como o estudo laboratorial de Hartmann et al. (2015) no qual mexilhões foram expostos à concentrações de NaCl simulando a dissolução de sais de degelo em locais com invernos rigorosos, como os EUA, tendo sido observada mudança no período de filtração dos animais expostos. Porém dentre os biomarcadores mais utilizados na ecotoxicologia atualmente estão: os histológicos, que são indicadores de lesões ou alterações histopatológicas, como atrofia no túbulo digestivo visto por Zorita et al. (2006) ao expor mexilhões à distintas concentrações de cobre; os fisiológicos, que são os marcadores que medem respostas como a alteração na estrutura e função de componentes biológicos, podendo até mesmo levar

à alterações comportamentais (Puntmann, 2009), sendo exemplos o nível de metabólitos no plasma, oxigenação de tecidos, função micro circulatória e fluxo sanguíneo renal (Camargo et al., 2006; Okusa et al., 2013).

Os biomarcadores utilizados neste projeto pertencem ao grupo de exposição, sendo biomarcadores bioquímicos, que medem os efeitos em tecidos-alvo do organismo em níveis celular e molecular, causados pela absorção de um contaminante químico ou seu metabólito; para contaminantes que possuem sua toxicocinética bem estabelecido na literatura é possível ainda estimar quantitativamente a dose de efeito. As medidas de danos em DNA e da atividade de enzimas do sistema antioxidante são alguns dos exemplos de biomarcadores bioquímicos bastante utilizados. Ekelund Ugge et al. (2020) analisaram a resposta das enzimas AChE e GST no bivalve de água doce *Anodonta anatina* à exposição em níveis ambientalmente relevantes de cobre, enquanto Bonnail et al. (2016) expuseram os animais da espécie *Corbicula fluminea* em laboratório à diversas concentrações de cobre e analisaram as respostas de diversos biomarcadores, entre eles GPx, GST e GR.

A utilização da GPx, GST e GSH neste projeto esta relacionada à análise da resposta dos organismos à presença de metais no ambiente através da determinação das atividades enzimáticas relacionadas com a depuração de contaminantes e da própria GSH.

A GSH (Glutationa reduzida) é a forma reduzida da glutathione, capaz de remover as espécies reativas de oxigênio ou eletrófilos (como metais) do meio intracelular, agindo de forma direta com, a partir das sulfidrilas presentes em sua estrutura. Essa reação faz com que a GSH se torne GSSG, ou seja, a forma oxidada da molécula. Para regenerar moléculas de GSH, é necessária a ação da enzima Glutationa Redutase (GR), que reduz a GSSG, utilizando a energia da transformação de um NADPH em NADP⁺ para a quebra da ligação dissulfeto (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001).

Já a GPx (Glutationa Peroxidase) é uma importante enzima do sistema antioxidante, pois participa do controle das espécies radicalares que danificam as membranas, os hidroperóxidos fosfolipídicos, pois possuem uma característica muito importante, a incorporação de uma selenocisteína em seu sítio ativo, sendo esta considerada o componente essencial dessa enzima (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001) para promover a detoxificação, a GPx oxida GSH em GSSG.

Por fim a GST (Glutationa-S-Transferase) representa uma família de enzimas que são mais encontradas em formas diméricas, sendo que cada dímero possui dois sítios ativos com independência de atividades, pois um sítio é específico para a ligação com a glutathione e a outra para ligar ao substrato. São enzimas multifuncionais, ou seja, conseguem catalisar a conjugação da GSH com o poluente, visando torná-lo mais solúvel e facilmente excretável (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001).

No caso do Rio Doce, os reais impactos, em curto e longo prazo, da contaminação causada pelos rejeitos de mineração ainda não são completamente conhecidos, assim como os efeitos nos organismos aquáticos. Nesse sentido, o uso de bioensaios com bivalves, visando avaliar potenciais efeitos

relacionados com os sedimentos contaminados pelos rejeitos liberados no desastre, é de alta importância para o entendimento dos danos e riscos ecológicos existentes no Rio Doce em decorrência do rompimento da barragem de Fundão.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho consistiu em determinar alterações metabólicas em bivalves da espécie *Corbicula fluminea* expostos a sedimentos do Rio Doce, após o rompimento da barragem de Fundão. Para alcançar os objetivos, foram realizados ensaios de toxicidade com sedimentos coletados na Bacia Hidrográfica do Rio Doce após o rompimento da barragem do Fundão em Mariana/MG, e medidos os biomarcadores relacionados com o sistema antioxidante e de conjugação, visando determinar alterações metabólicas nos animais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de Estudo

A Bacia do Rio Doce está inserida nos estados de MG e ES. Outra importante característica da Bacia do Rio Doce é sua diversidade de ambientes ao decorrer dos 86.715 km² de extensão, pois aproximadamente 98% da bacia hidrográfica está situada no bioma Mata Atlântica e os restantes 2% são compostos de Cerrado, sendo ambos de importante biodiversidade e endemismo (IBAMA, 2015). Além de possuir esta importância ecológica, antes do rompimento da barragem, a Bacia Hidrográfica do Rio Doce era uma fonte de água utilizada por diversas indústrias e outros setores econômicos, como a agricultura, além de servir como abastecimento para diversas cidades pelo decorrer de sua extensão, as quais totalizam cerca de 3,6 milhões de habitantes (Consórcio Ecoplan Lume, 2010).

Para as coletas, foi considerada a divisão da área de estudo em Alto, Médio e Baixo Rio Doce, sendo que cada uma destas porções sofre impactos causados por diferentes fontes. O Alto Rio Doce, onde se encontram suas nascentes (Vieira, 2009), possui como principal atividade impactante as instalações de mineradoras e seus respectivos reservatórios de rejeitos (Rhodes, 2010), porém vale ressaltar estudos recentes como Gomes et al. (2022) que mostram a necessidade de monitoramento de outros contaminantes como fármacos e pesticidas nessa região, já que estes foram encontrados em altas concentrações em alguns pontos dos rios Gualaxo, Carmo e início do Rio Doce.

Essa região é a mais próxima do complexo de mineração da Samarco, uma das principais estruturas de exploração do minério de ferro do Quadrilátero Ferrífero (QF). Uma de suas principais atividades são os complexos industriais do Vale do Aço. Na mesma região do QF, a leste, encontra-se a Serra do Caraça, parte do conjunto de serras e morros da região, sendo muito importante pela grande

produção de ferro, manganês, alumínio e ouro, sendo assim nesses vales há instalações da Vale, Samarco e outras mineradoras (Reis et al., 2019; Carmo et al., 2017; Vervloet, 2016). Na porção Média do Rio Doce, alguns dos principais impactos encontrados é a descarga de efluentes domésticos com baixo ou nenhum tratamento prévio, sendo que é nesta área em que se encontra Governador Valadares, um dos maiores municípios da bacia. Também é possível encontrar nesta região do médio Rio Doce diversos empreendimentos como a pecuária e presença de empresas siderúrgicas, de produção de celulose e aço. (ANA, 2016; IBAMA, 2015; Dias et al. 2018).

Por sua vez, o Baixo do Rio Doce, que se inicia no ponto de Aimorés, indo até o ponto Linhares, onde esta presente a foz, no Oceano Atlântico, é influenciado ainda por rejeitos sanitários de diversas cidades presentes na região, assim como à utilização desta porção para pecuária e agricultura (Consórcio Ecoplan Lume, 2010; IBAMA, 2015). Segundo Rodrigues et al. (2016) esse trecho possui melhores condições de conservação ambiental ao longo do Rio Doce, porém um dado importante é que em sua foz, no distrito de regência, em Linhares, a população desenvolve a atividade de pesca artesanal, logo, com a passagem dos rejeitos do Fundão estes moradores ficaram impossibilitados de utilizarem o mesmo para suas atividades de subsistência e culturais, sendo então um grande impacto sócio econômico causado pelo rompimento da barragem (Creado, 2016). Nessa região as atividades de agropecuária produzem impactos adicionais, como erosão, resultante do desmatamento acelerado, que leva ao assoreamento dos cursos do rio e também a contaminação das águas residuais, assim como o uso indiscriminado de pesticidas e agrotóxicos nas áreas de lavouras (Consórcio Ecoplan Lume, 2010; ANA, 2016).

3.2. Coletas

Ao todo foram realizadas quatro campanhas de coleta, sendo a primeira entre novembro e dezembro de 2015, logo após o desastre, onde apenas dois dos pontos coletados foram analisados para os biomarcadores. A segunda um ano depois, em novembro de 2016, havendo 10 pontos analisados, incluindo Manhuaçu que foi a referência para as campanhas 1 e 2, por ser um ponto localizado fora da área afetada pelo rompimento da barragem, consideramos que este pode ser usado como referência para a campanha 1, pois suas alterações são as naturais do rio onde se encontra e não tendo relação com o incidente. Por fim, foram realizadas outras duas coletas em janeiro de 2019 e julho/agosto de 2019, sendo em ambas as campanhas coletados 8 pontos para a análise dos biomarcadores. No caso destas duas últimas coletas a referência foi coletada em ambas as ocasiões foi um ponto presente no Rio Corrente, sendo denominado como Referência durante o trabalho, não afetado pelo rompimento da barragem. Todas as amostras se encontraram devidamente armazenadas, em 4°C para análises ecotoxicológicas e -20°C para as análises químicas, nos laboratórios da Unesp e do Instituto de Pesca anteriormente ao seu uso.

A tabela 1 abaixo mostra os nomes dos pontos de cada campanha de coleta, estando esses organizados do Alto ao Baixo Rio Doce.

Tabela 1- Pontos de coleta da primeira à quarta campanha. De cima para baixo os pontos estão organizados do Alto ao Baixo Rio Doce, com exceção aos pontos em verde, Manhauçu e Referência(s), que são os controles. A última coluna à direita se refere a sigla utilizada para determinar Alto (A), Médio(M) e Baixo(B) Rio Doce.

Pontos de Coleta			
1ª Campanha	2ª Campanha	3ª Campanha	4ª Campanha
Gualaxo - A	Gualaxo - A	Gualaxo - A	Gualaxo - A
Ipatinga - M	Paracatu - A	Candongá - A	Candongá - A
	Piranga - A	Naque - M	Naque - M
	Rio Doce - A	Gov. Valadares - M	Gov. Valadares - M
	BR 262 - A	Aimorés - B	Aimorés - B
	Piracicaba - M	Colatina - B	Colatina - B
	Naque - M	Linhares - B	Linhares - B
	Gov. Valadares - M	Referência - M	Referência - M
	Galileia - M		
	Manhuaçu - B		

As coordenadas geográficas dos pontos de coleta de todas as campanhas estão representadas pela tabela 4, em Anexo II, tendo sido separadas em ID amostral/coordenadas para campanhas 1 e 2 e logo abaixo ID amostral/coordenadas para campanhas 3 e 4. Na figura 1, podemos visualizar as localidades de todos os pontos das 4 campanhas realizadas. Estes pontos de amostragem foram escolhidos com base nas regiões influenciadas pela passagem dos rejeitos do rompimento da barragem, ao longo de todo o trecho afetado, que inclui os rios Gualaxo do Norte, Carmo e Doce.

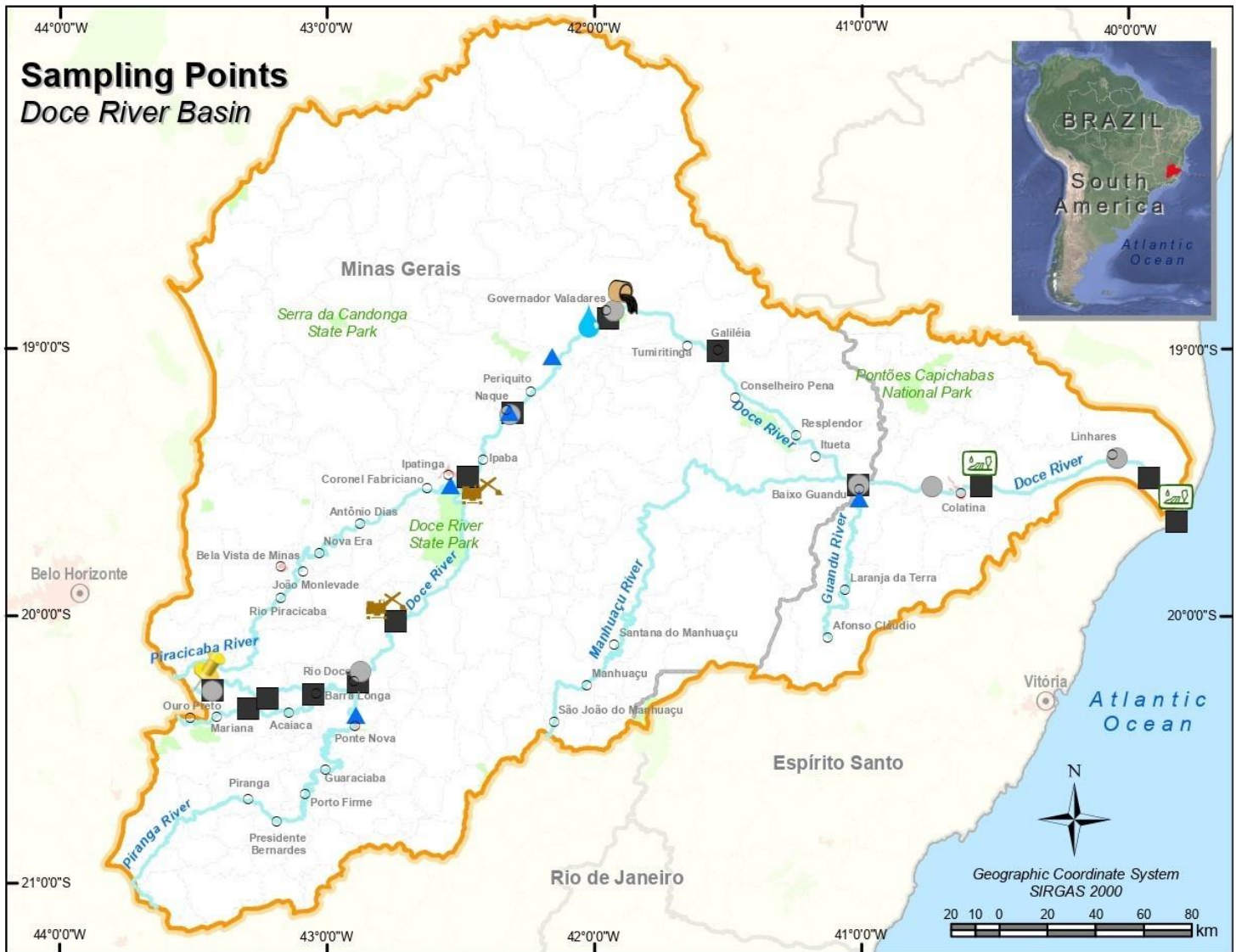


Figura 1 – Mapa com os pontos das 4 campanhas de coleta realizadas ao longo de Rio Doce e rios adjacentes.

3.3. Organismo-teste

No presente estudo, foi utilizado o bivalve exótico *Corbicula fluminea*, para a realização dos bioensaios laboratoriais. A utilização dessa espécie como organismo modelo do estudo, por sua vez, se baseia no fato de que estes animais filtradores possuem ótima capacidade de bioacumulação dos contaminantes, como metais, além de estarem em contato tanto com o sedimento quanto com as partículas em suspensão na água próxima ao substrato (Abessa, 2016; Guo, 2018), podendo revelar os efeitos cumulativos ambientais, já que em ecossistemas os contaminantes se apresentam em mistura (Rocha & Souza, 2012). Além disso, esta espécie responde de forma muito similar às nativas, logo a resposta que apresentam em relação aos efeitos destes metais também pode ser extrapolada àquelas pertencentes à nossa fauna (Abessa, 2016). Adicionalmente, a utilização de *C. fluminea* não acarreta em danos ecológicos à populações de espécies nativas, sendo um importante aspecto por muitas destas já se encontram em algum grau de ameaça.



Figura 2 – Fotografia de um indivíduo da sp. *Corbicula fluminea* exposto aos sedimentos contaminados da campanha 4. A foto foi tirada durante a verificação de organismos mortos.

3.4. Amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas a cerca de 10 metros de distância da margem, em profundidades variando de 0 a e aproximadamente 15 cm. As coletas utilizaram pás plásticas e os sedimentos foram acondicionados em sacos plásticos ou frascos. As alíquotas destinadas para as análises ecotoxicológicas e químicas foram refrigeradas à 4°C até seu respectivo uso.

3.5. Análises Químicas

A análise de metais traço em sedimento foi feita submetendo as amostras a uma técnica de digestão parcial seguindo o procedimento SW 846 US EPA 3050b (USEPA, 1996). Consiste em uma lixiviação ácida em que dissolve elementos ligados à matéria orgânica, carbonatos, óxidos de Fe / Mn e adsorvidos em partícula. Dessa forma, amostras de sedimento foram secas em estufa a 60°C, por 72h, e

depois foram maceradas com o auxílio de pistilo e almofariz. Em seguida, para a extração ácida dos sedimentos, 1 g de cada amostra foi transferido para tubos de vidro, mantidos em bloco digestor a 95°. Foram adicionados aos tubos 5 mL de HNO₃ (1:1) e aguardado de 10 a 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de HNO₃ concentrado. Transcorridos 90 minutos, foram adicionados 1 mL de H₂O₂ e 1,5 mL de água ultrapura (Milli-Q®) e aguardados 120 minutos. Após este período, os tubos contendo as amostras receberam 1 mL de H₂O₂ a cada 15 minutos, até atingir o volume de 5 mL. Por fim, foram adicionados 5 mL de HCl, e os tubos foram mantidos no bloco digestor por mais 15 minutos, quando foram retirados do aquecimento. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 50 mL com água ultrapura (Milli-Q®) e as amostras filtradas, sendo mantidas sob refrigeração até as análises. Assim, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram quantificados por espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Estas análises químicas foram feitas pelo Laboratório de Química Inorgânica (LaQIMar) do Instituto Oceanográfico da USP, coordenado pelo Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira.

3.6 Ensaio de exposição

Nem todos os sedimentos coletados nas campanhas, foram utilizados nos ensaios de exposição, sendo apenas os pontos expostos na tabela 1 os que foram utilizados para a exposição dos animais, isso se deve por questões de baixa quantidade amostral de sedimentos nas primeiras campanhas, pois não seria possível realizar triplicada, já que parte dos sedimentos que foram recolhidos, foram destinados à demais experimentos, como bioacumulação e testes com outros indivíduos, inviabilizando a utilização de sedimentos destes pontos faltantes para os biomarcadores.

Para os ensaios de exposição aos sedimentos da Bacia do Rio Doce, primeiramente os indivíduos de *C. fluminea* foram coletados no Rio Ribeira de Iguape, na região do município de Sete Barras, região do Vale do Ribeira (sudoeste de SP). Os organismos foram colocados em caixas de plásticos em ambiente umedecido e então transferidos para o local de estudos para a aclimação, de 72 horas, localizado no Campus do Litoral Paulista da UNESP, o Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática, onde foram mantidos em caixas de 50L, contendo água do local de coleta dos animais, sob aeração constante e fotoperíodo 12h:12h (claro:escuro).

Os testes foram realizados com base nos protocolos propostos pela USEPA (1993) e USEPA (2000), com adaptações de Abessa (2016). Para cada amostra de sedimento a ser testada, foram consideradas três réplicas, preparadas em frascos de polipropileno com capacidade máxima de 1,2 L, preenchidos com 800 ml de água de diluição e 4 cm do sedimento (figura 3). Com relação aos sedimentos, estes estavam armazenados separados em 3 réplicas de cada campanha, logo, ao montar o experimento foi realizada a mistura homogênea das réplicas em cada frasco de seus respectivos pontos. Os ensaios foram mantidos sob aeração constante, temperatura de 25° C (± 2 °C) e fotoperíodo de 12:12

(claro/escuro), sem adição de alimentação suplementar. Foram introduzidos de 8 à 15 organismos em cada réplica, à depender da quantidade de indivíduos que foram coletados para a exposição e seus tamanhos, mantendo ao máximo uma homogeneidade de massa total. Foi verificada a presença de indivíduos mortos a cada 24h, os quais foram removidos no decorrer dos ensaios (figura 3).



Figura 3 – Frascos de cada ponto da campanha 4 (Inverno) em triplicata com os bivalves expostos à sedimentos, foto tirada ao início do experimento (T0)

Os animais sobreviventes foram sacrificados ao final do período de 14 dias de exposição, logo após a sua retirada de cada frasco, sendo dissecados para a extração dos tecidos moles internos, os quais foram acondicionados em eppendorfs e armazenados em ultrafreezer à - 80 °C.

Os parâmetros físico-químicos da água foram medidos tanto no início (T0) quanto ao final dos experimentos (T14) em cada campanha, sendo escolhida uma das 3 réplicas para a realização da medição dos parâmetros.

Para a medição dos teores de oxigênio dissolvido foi utilizado um oxímetro (Figura 4), assim como o pH foi medido a partir da utilização de um pHmetro depois da devida calibração do mesmo. No momento inicial os parâmetros foram medidos antes da inserção dos animais nas réplicas de sedimento, dado o intervalo de descanso (para os animais se enterrarem no substrato), no tempo final (T14) os parâmetros foram medidos pouco antes da retirada dos animais de dentro dos frascos de exposição para a coleta dos tecidos mole.



Figura 4 – Medição dos parâmetros de O₂ com a utilização de um oxímetro no primeiro dia do experimento de exposição à sedimentos de 2019/Inverno.

3.7 Biomarcadores

Para a análise de biomarcadores, alíquotas dos tecidos moles internos retirados destes animais foram descongelados, pesados e homogeneizados sobre gelo em solução tampão na razão 1:4 (peso/volume) de TRIS 50mM; EDTA 1mM; DTT 1mM, sacarose 50mM, KCl 150mM, PMSF 1mM, e pH ajustado em 7,6. Após a homogeneização as amostras foram então transferidas para microtubos e centrifugadas por 30 minutos, à 4°C e 9000 rpm, separando o sobrenadante em um novo microtubo e mantido à -80 °C no ultrafreezer para análises posteriores.

A dosagem de GSH foi medida por absorbância para a quantificação dos grupos sulfidrilas presentes na amostra, de acordo com o método de Sedlak & Lindsay (1968), por espectrofotometria à 415nm. As amostras ainda congeladas do tecido tiveram 50µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 50% adicionados ao sobrenadante. Após misturar bem, 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 50µL da solução de TCA à 50% em 200µL de PBS em microplaca (triplicata), a curva padrão também foi realizada em triplicata no volume de 50µL. Os resultados foram expressos em nmol glutationa por mg proteína.

A quantificação da atividade enzimática da GST foi adaptada de McFarland et al. (1999). Para quantificar o branco foi utilizada uma amostra de 20µL de tampão de homogeneização (Fontes, 2016). Já com relação à análise foram usados 42 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1mM de GSH como substrato. O S-2,4-dinitrofenilglutaciona 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 finais expressos em nmol. min⁻¹.mg⁻¹ proteína total.

Para a solução tampão serão preparadas duas soluções: a primeira, básica, a partir da diluição de 6,9672g de K₂HPO₄ em 400 mL de água Mili-Q e a segunda, ácida, com KH₂PO₄ em 400 mL de água

Mili-Q (Fontes, 2016). A solução do meio de reação possui pH 6,5, tendo sido feita pela mistura inicial de 0,02g de CDNB em 500 μ L de etanol, então a solução resultante foi adicionada à outra composta por 0,24 g de Hepes (10 mM), 0,03g GSH (1 mM) e 0,73 g de NaCl (125 mM) diluídos em 100 mL de água destilada (Fontes, 2016).

A atividade da GPx foi medida por espectrofotometria à 340 nm à cada 2 minutos por 10 minutos, utilizando 9,7 μ L de hidroperóxido de cumeno 1 mM incubada em temperatura de 30 °C como substrato (McFarland et al., 1999) e 20 μ L 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 500 mL de água Milli-q: 3,405g de KH₂PO₄ (50mM), 0,0186g de EDTA (0,1 mM) e 0,00488g de azida sódica (0,15 mM), já a básica foi composta por 8,71g de K₂HPO₄ (50mM), 0,0372g de EDTA (0,1 mM) e 0,00975g de azia sódica (0,15 mM) em 500 mL de água Milli-q. A solução diária, cujo prazo de validade é de apenas 4h, foi feita em falcon de 50 mL formada por 0,0461 g de glutathiona reduzida e 0,146g de NADPH, agitada e por fim incubada à 30 °C.

3.8 Análises Estatísticas

Os dados ecotoxicológicos foram primeiramente verificados quanto a distribuição normal e homogeneidade das variâncias, pelos testes de qui-quadrado e Bartlett, respectivamente. Em seguida, para comparar os resultados obtidos com o grupo controle e entre eles foi usada a ANOVA de uma via para dados que se apresentaram normais em relação às variâncias e Kruskal-Wallis para aqueles que foram heterocedásticos ou não normais, sendo usado o teste de Dunn como a comparação *a posteriori* para verificar quais pontos diferiram entre si. Ainda, por fim foi realizada a Correlação Linear de Pearson entre as médias de cada um dos biomarcadores em cada ponto e os valores de metais resultantes das análises químicas, em mg/kg, para verificar assim as associações entre as variáveis GSH, GST, GPx e metais. Tanto a correlação, quanto os testes de ANOVA e Kruskal-Wallis foram realizados a partir do programa Past4.03. Os gráficos de barra por sua vez foram realizados a partir do programa Graph Pad 5.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análises Químicas

Os resultados das análises químicas na tabela 2 demonstraram que na Campanha 1 o Ferro (Fe) e Alumínio (Al) foram metais que tiveram altas concentrações em todos os pontos observados, além disso, em Gualaxo do Norte nota-se um valor mais elevado de Arsênio (As) e Cádmiio (Cd) com relação aos limites permitidos pelo CONAMA (CONAMA 454/2012). Os altos valores destes metais podem ser explicados pela composição da pluma de rejeitos, por serem relacionadas a mineração, pois segundo Pires et al. (2003) minerais como hematita e goethita possuem respectivamente 63,6% e 24,6% de Fe em sua composição, da mesma forma que a caulinita possui uma porcentagem de Al, sendo estes parte

dos rejeitos da mineração. Além disso, o laudo realizado pelo IBAMA anteriormente ao rompimento da barragem do Fundão mostrou que tanto essa quanto a barragem de Germano já apresentavam rejeitos quase completamente compostos por ferro e sílica, além de apontar que os demais metais traços podem estar relacionados tanto as contaminações localizadas quanto à dependência das características dos tipos de minérios e estéreis envolvidos na mineração (IBAMA, 2015).

Em comparação com a Campanha 1, na 2ª Campanha, realizada em Novembro/2016 durante o período chuvoso, os sedimentos apresentaram concentrações de metais em níveis menores, sendo alguns dos principais exemplos os níveis de Fe, Al e Manganês (Mn), com excessão do ponto Gualaxo do Norte para Fe. Apesar dos resultados das análises químicas desta campanha apresentarem níveis de metais abaixo daqueles encontrados logo após o incidente, demais estudos demonstraram que durante os períodos chuvosos ocorre a ressuspensão de sedimentos junto de contaminantes para a coluna d'água, principalmente na região próxima ao sedimento, o que pode levar, por exemplo, à níveis extremamente altos de metais durante essa época do ano nos sedimentos mais superficiais e coluna d'água próxima à estes, assim como alterações significativas na defesa e controle redox de animais da região (Gabriel et al., 2020; Mendes et al., 2020).

Ainda em relação aos altos níveis do fluxo do rio durante o período de coleta, segundo Oliveira et al. (2017) as atividades antrópicas na Bacia Hidrográfica do Rio Doce, assim como efeitos mais globais como as mudanças climáticas, podem estar influenciando a disponibilização dos metais no sedimento e coluna d'água, pois foi visto um aumento de magnitude em fenômenos que controlam o alto fluxo de água no rio durante as chuvas, como a variação da Zona de Contingência do Atlântico Sul nos meses de Outubro, Novembro e Dezembro, além de uma série de impactos como o desmatamento e erosão do solo causados pelas atividades locais como agricultura e a própria urbanização.

A Campanha 3 por sua vez traz dados de aproximadamente 3 anos após o rompimento da barragem, início de 2019, durante o período chuvoso (Verão). Como pôde ser observado na tabela 2, houve um aumento das concentrações de metais em geral quando comparado com a campanha anterior, havendo elementos quantificados em níveis acima dos limites permitidos pelo CONAMA 454/2012 para sedimentos dragados em corpos hídricos Classe 1, com relação ao metalóide As, nos pontos Gualaxo, Candonga e Naque, e ao metal Cd nos pontos Gualaxo, Candonga e Referência. Porém, também é possível ver uma diminuição do nível de Cromo (Cr) em Piracicaba entre estas mesmas campanhas, onde o ponto volta a estar abaixo do limite do CONAMA.

Por fim, a 4ª Campanha, realizada no período seco (Inverno) apresentou em comparação com as demais campanhas uma quantidade maior de metais acima do limite aceitável estabelecido pela legislação para As, Cd, Cr e Níquel (Ni). Sendo os pontos da porção do Alto do Rio Doce (Gualaxo, Candonga e Naque) as que mais apresentaram discrepâncias com o limite do CONAMA 454/2012, principalmente para As. Governador Valadares também obteve altas proporções de metais de forma

geral, o que podem estar associadas à própria contaminação local, principalmente do aporte de efluentes domésticos e industriais com baixo ou nenhum tratamento prévio (ANA, 2016; Dias et al., 2018). Esse resultado na campanha 4 pode estar relacionado ao baixo fluxo do rio e maior estabilidade do substrato durante esse período do ano, o que torna as contaminações mais localizadas (Alfenas, 2010; Marques & Barbosa, 2001). Da mesma forma, atividades antrópicas presentes ao longo do rio, podem levar à poluição crônica de pontos próximos à estas. Segundo o relatório do IGAM (2020) após passados 3 anos do desastre, as regiões mais próximas ao rompimento da barragem apresentam concentrações permanentemente altas de As.

Ainda, o aumento dos metais ao longo do tempo, principalmente nas campanhas 3 e 4, podem estar relacionados com a natureza do Fe em sedimentos de baixo O₂, pois segundo Queiroz et al. (2022) locais como o Rio Doce, rios de fluxo variável ao longo do ano apresentando também ambientes estuarinos, possuem uma alta variação diária, sazonal e espacial de componentes abióticos, como por exemplo o sedimento próximo ao estuário sendo mais anóxico e variação redox de acordo com o fluxo do rio, além da atividade biótica da fauna local. Assim, ao serem liberados, estes rejeitos de oxihidróxido de Fe entraram em contato com esse ambiente dinâmico, modificando a matriz cristalina para minérios de baixa cristalização, seja pela alteração constante da capacidade redox do ambiente ou pelo consumo do Fe pela microbiota local (Queiroz et al., 2022). Sabe-se que o oxihidróxido de ferro, quando estável, em alta cristalização, possui a capacidade de reter metais, porém quando este passa a apresentar uma baixa cristalização, torna-se mais fácil de dissoluir, levando então à diminuição da capacidade do solo de reter elementos como os demais metais e permitindo dessa forma um aumento da biodisponibilização e contaminação por estes no sedimento (Queiroz et al., 2021; Queiroz et al., 2022).

Esses valores distintos de metais entre as campanhas, principalmente quando comparamos campanha 3 (verão/2019) e campanha 4 (inverno/2019), possivelmente se devem às próprias mudanças do rio, pois sabe-se que fenômenos comuns dessas regiões estuarinas como as mudanças no fluxo do rio podem modificar a mobilidade e disponibilidade dos metais em sedimento, coluna d'água e material particulado em suspensão (Viana, 2020), pois podem ressuspender os metais junto do sedimento.

O encarte especial de qualidade das águas realizado pela IGAM (2020) também analisou a concentração dos metais no sedimento, tendo como base de comparação os valores pelo trabalho de Costa (2015), já que o CONAMA não possui referência para ferro, alumínio e manganês. Neste encarte foi observado que as concentrações dos contaminantes estão diminuindo ao longo do tempo e que ferro dissolvido aparece com valores mais elevados nos sedimentos em Gualaxo do Norte e outros trechos mais próximos do rompimento da barragem, enquanto alumínio apresentou um comportamento inverso, com concentrações maiores à jusante do rio. Mesmo que os dados dos metais analisados neste trabalho tenham mostrado um padrão de aumento dos metais disponíveis no sedimento com o tempo, diferente do resultado encontrado pelo IGAM, um padrão similar encontrado principalmente nas campanhas de

2019 é o da dispersão dos metais Fe e Al, sendo o Alto Rio Doce mais afetado pelo Fe e o Baixo pelo alumínio, porém em nosso trabalho nota-se também uma forte presença do Médio Rio Doce, principalmente Governador Valadares, nos maiores valores destes metais.

Tabela 2 – Análises de metais presentes nos sedimentos coletados por este trabalho ao longo do Rio Doce. Os números apresentados em vermelho estão em discordância com o limite apresentado pela classificação de sedimentos dragados para Classe I do CONAMA 454/2012. Com relação aos nomes da coluna Amostras, em vermelho estão as pertencentes à Campanha 1, em amarelo Campanha 2, Laranja Campanha 3 e Azul Campanha 4, também nota-se que o ponto referência para as campanhas 1 e 2 esta destacado em Verde. Os metais em cinza são os que não possuem limite determinado pela legislação.

Amostras (mg/kg)	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al
Classe I CONAMA 454/2012	5,9	0,6	37,3	35,7	-	18	35	123	-	-
Gualaxo do Norte	27,15	1,73	13,19	12,43	7408,95	7,95	5,37	15,89	48216,15	3802,52
Ipatinga	5,29	1,09	29,92	10,55	439,54	8,96	5,50	24,05	56340,40	10839,10
Gualaxo do Norte	23,58	1,22	12,79	20,29	5817,66	8,78	5,13	16,22	80944,65	3850,11
Paracatu	1,26	0,41	4,79	2,79	261,48	2,29	1,65	8,36	22551,05	1248,82
Rio Doce	1,71	0,13	2,28	1,56	72,87	1,31	0,63	5,38	7971,52	600,88
BR 262	2,32	0,49	4,39	1,69	61,60	1,76	1,70	6,45	29020,15	1449,64
Naque	9,18	0,65	35,09	12,09	236,52	10,33	9,99	38,27	42573,75	30285,75
Governador Valadares	1,93	0,27	17,38	8,44	112,65	6,51	4,68	27,44	18700,80	9860,37
Galiléia	1,78	0,06	9,01	1,54	82,08	2,47	1,16	8,06	4788,29	1816,26
Piranga	1,45	0,20	22,27	7,71	63,17	7,76	3,18	22,77	12288,05	7327,32
Piracicaba	3,47	0,27	39,92	5,35	74,02	11,26	4,74	53,60	19758,80	6785,45
Manhuaçu	<LQM	0,03	3,36	0,98	1508,08	33,06	0,56	0,78	4,45	906,00
Gualaxo	29,07	1,54	16,49	26,98	12092,05	13,94	8,92	18,96	75634,15	5359,30
Candongá	6,20	0,71	18,14	7,15	309,09	7,14	4,84	17,77	35743,73	11432,65
Naque	7,58	0,70	31,94	6,34	348,48	9,92	5,86	25,70	38465,43	9426,80
Gov. Valadares	3,84	0,65	21,27	6,91	125,73	6,59	8,25	25,20	20543,51	12434,38
Aimorés	1,97	0,50	24,49	6,82	256,41	7,38	7,73	26,14	27520,10	18902,63
Colatina	3,60	0,29	14,53	3,55	94,35	5,38	3,97	16,89	17081,36	9258,51
Linhares	3,49	0,28	15,00	4,16	152,70	6,76	4,30	22,09	16694,20	10172,90
Referência	4,84	1,39	24,32	14,01	465,30	7,22	28,23	69,58	71479,63	45528,97
Gualaxo	47,76	5,14	16,38	14,51	11373,07	11,31	12,92	36,13	286494,33	4941,46
Candongá	26,71	1,31	28,13	23,03	1270,57	25,45	7,39	38,09	60587,27	28652,25
Naque	17,40	1,56	54,93	15,96	1777,69	20,51	10,57	50,24	95912,75	36431,55
Gov. Valadares	13,05	1,91	65,61	22,78	452,30	23,24	20,27	83,23	82645,30	42707,03
Aimorés	3,15	0,37	16,22	5,23	105,14	4,86	5,41	20,76	22167,77	16893,03
Colatina	6,75	0,72	37,87	12,07	203,69	15,22	10,36	49,95	40260,80	39474,60
Linhares	5,13	0,25	11,89	2,56	92,77	3,54	2,96	11,48	16145,84	7343,34
Referência	5,90	1,58	28,77	17,27	718,14	9,30	32,70	85,67	75212,55	466555,75

Legenda de Cores

1ª Campanha	2ª Campanha	Referência 1ª e 2ª Campanhas	3ª Campanha	4ª Campanha

4.2 *Parâmetros Físico-Químicos*

Na campanha 1 os parâmetros Físico-químicos da água entre o dia 0 e 14 de exposição obtiveram pH entre 7.12 e 7.22 ao final do experimento e O₂ entre 5.88 e 6.0 mg/L.

Na campanha 2 houve uma variação final do pH de valores entre 7.11 e 7.84, assim como para O₂ estes estavam entre 5.2 e 6.0 mg/L.

Na campanha 3, os parâmetros Físico-Químicos obtiveram pH, entre 7.35 e 7.63 no fim do experimento, apenas com exceção de Referência (Rio Corrente) que foi de 7.25 para 6.24 e Gualaxo de 7.62 para 7.47. Com relação ao O₂ todos os pontos apresentaram valores entre 4.10 e 4.86 mg/L.

Na campanha 4 todos os pontos foram iniciados em pH de valor 6.93 por ser o pH da água de diluição utilizada no teste e tendo ao fim uma variação de 7.34 à 8.17, já o O₂ se iniciou com valores entre 6.36 e 6.80mg/L e ao final do experimento apresentou valores entre 7.26 e 8.21 mg/L.

A tabela com os valores iniciais e finais das campanhas podem ser observadas no Anexo III.

4.3 *Análise dos Biomarcadores*

Em relação à GPx, apenas na campanha 3 houve diferenças significativas, sendo essas entre o ponto Aimorés e o controle, assim como Aimorés com Gualaxo e Candonga, também houve diferença entre Candonga e Linhares, sendo Aimorés e Linhares os pontos com maiores valores de GPx nessa campanha (figura 5). Nas demais campanhas não houve diferença significativa.

Quanto a GST (figura 6) se observou diferenças significativas também na terceira campanha, sendo essas entre Colatina e o controle, entre Colatina e Gualaxo, entre Colatina e Candonga, entre Colatina e Naque e entre Colatina e Linhares, sendo Colatina o ponto com menor atividade dentre esses, a campanha ainda apresentou diferenças entre Naque e Linhares, com relação às demais campanhas não se observaram diferenças significativas, porém é possível notar um aumento não estatístico em animais expostos ao sedimento de Gualaxo do Norte (campanha 1) e Gualaxo, Paracatu, Piranga, Rio Doce, Piracicaba, Governador Valadares e Galiléia, na segunda campanha.

Por fim, a análise da GSH revelou diferenças significativas entre os valores do controle com Rio Doce, BR 262 e Piracicaba na segunda campanha, sem diferenças nas demais campanhas. Porém mesmo que não estatisticamente significativos, alguns dos valores mais altos ocorreram na campanha 1 (Gualaxo do Norte e Ipatinga), campanha 3 (Candonga) e campanha 4 (Gov. Valadares) como indicado na figura 7.

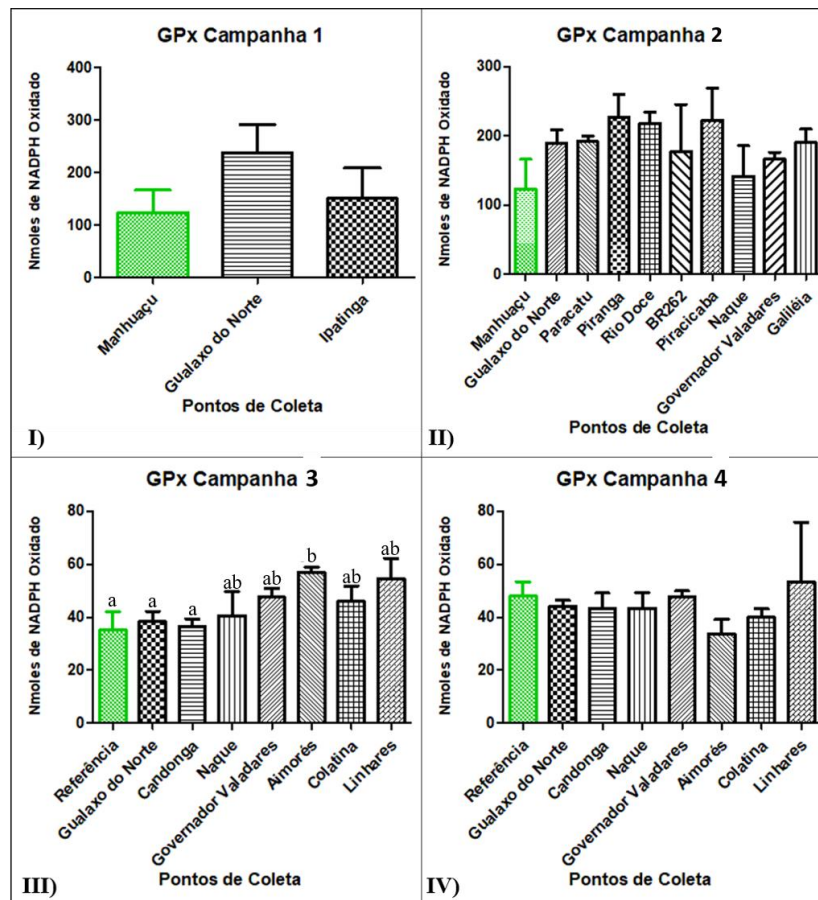


Figura 5 - Comparação da atividade de GPx nas coletas 1, 2, 3 e 4. A barra em verde corresponde ao controle. Na campanha 3, letras diferentes representam diferenças significativas. No canto inferior esquerdo dos gráficos I) se refere à Campanha 1, II) Campanha 2, III) Campanha 3 e VI) Campanha 4.

Os resultados de GPx demonstraram diferença significativa entre os pontos de coleta apenas na campanha 3 nomeados pelas letras a e b, onde os pontos presentes no Alto Rio Doce apresentaram valores menores do que os presentes no Baixo Rio Doce. Nesta campanha, o Cádmiu e o Arsênio se apresentaram mais elevados, em especial no Alto Rio Doce, sendo os pontos Gualaxo do Norte, Candonga e Naque acima do valor referência para concentração de metais em sedimentos dragados em recursos hídricos classe I pelo CONAMA, além disso é possível notar que o Fe, metal traço do rompimento, também se apresentou mais elevado na maioria dos pontos na terceira campanha com relação à segunda, com exceção de Gualaxo do Norte. Esses resultados são possivelmente devidos à proximidade com a antiga mineração do Quadrilátero Ferrífero (IBAMA, 2015) e a própria barragem de Fundão.

Enquanto as campanhas mostram uma diminuição da atividade da GPx, as análises químicas (tabela 2/Anexo IV) mostram que com o passar do tempo há o aumento dos metais no sedimento, com pontos de coleta apresentando níveis de metais superiores à legislação para As, Cd e Cr, assim como, na campanha 4 pontos acima para Ni. Segundo Kucuksezgin (2007), a GPx pode ser inibida de forma

irreversível quando exposta à altas concentrações de metais e metalóides no ambiente. Porém ao se observar as enzimas GST e GPx, juntamente das GSH é possível notar que estas permanecem em atividade, principalmente a GSH, mesmo que em menor quantidade, nos permitindo inferir que ao menos parte dos metais continuam sendo depurados pelo sistema antioxidante da GSH (Huber et al., 2008; Rover et al., 2001), principalmente em candonga e no médio Rio Doce e que essa diminuição de atividade e concentração esta mais associada à ativação de demais vias metabólicas como visto por de Oliveira et al. (2018).

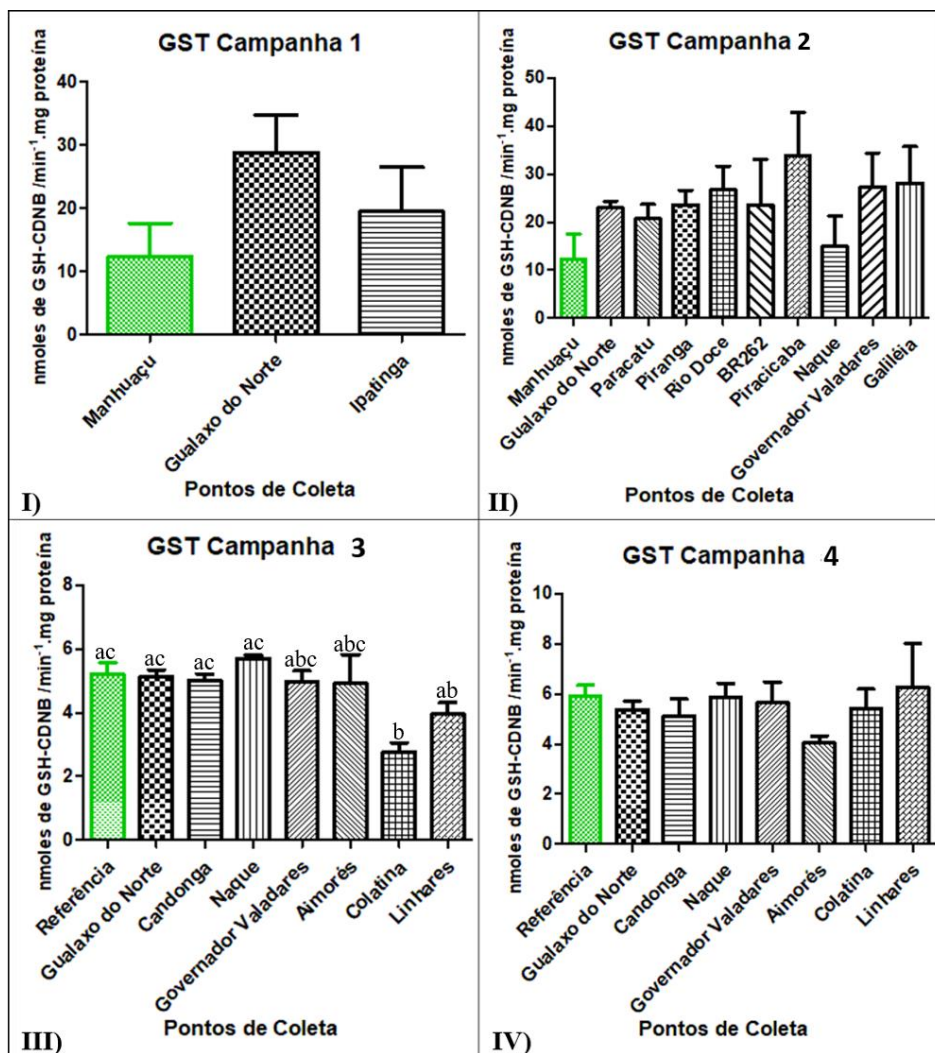


Figura 6 - Gráficos de barra comparando a atividade da GST entre os pontos em cada campanha de coleta. O ponto considerado controle em cada campanha está diferenciado em cor verde. É possível observar na campanha 3, as diferenças significativas encontradas nomeadas por letras de a à c. No canto inferior esquerdo dos gráficos I) se refere à Campanha 1, II) Campanha 2, III) Campanha 3 e VI) Campanha 4.

Com relação à GST, foi observado diferença estatística significativa também para as amostras da campanha 3, onde os pontos no Alto do Rio Doce apresentaram valores mais altos do que aqueles presentes no Baixo Rio Doce, onde as amostras do sedimento controle apresentou valores altos. Nas

campanhas 3 e 4 foi observada uma redução nas atividades de depuração tanto da GPx quanto da GST, quando comparadas ao controle, não apresentando diferenças significativas entre as campanhas 3 e 4. Isso pode tanto indicar um efeito inibitório pela mistura de metais em altas concentrações (Bigot, 2010), como observado por Bonnail et al. (2016) em *Corbicula fluminea* em condições laboratoriais expostos à concentrações de cobre (Cu), (acima do limite do CONAMA para água doce Classe III), os quais causaram alterações na concentração de GST atuando na diminuição de sua atividade. Assim como, pode estar relacionada possivelmente à ativação de demais vias de depuração com o aumento dos metais no ambiente, sendo exemplos as metalotioneínas, proteínas de baixo peso molecular responsáveis pela depuração de metais essenciais e não-essenciais no citosol, sendo exemplos o Cu e o Cd, e a família de enzimas Peroxirredoxinas (Prx), que lidam com estresse oxidativo causados por metais e orgânicos (Bonnail et al., 2016; Drago, 2022; Trevisan et al., 2014).

A metalotioneína dos *C. fluminea* expostos aos sedimentos das campanhas 3 e 4, também foi quantificada por nosso grupo de pesquisa em um trabalho ainda não publicado. Esse trabalho mostrou um aumento estatisticamente significativo entre essas campanhas, sendo o inverno (Campanha 4) onde houve uma maior concentração de metalotioneína, seguindo assim, o padrão de aumento que os metais demonstraram no sedimento. O Cd é um exemplo claro dessa situação, pois sabe-se que este é um dos principais metais não essenciais que se associam à metalotioneína (Bonnail et al., 2016) e é possível notar seu aumento, levando até a apresentar concentrações acima da legislação em quase todos os pontos da campanha 4 (tabela 2).

Além disso, Drago et al., 2022 realizaram um estudo molecular com o grupo de enzimas 2-cys Prx da espécie marinha de tunicata *Ciona robusta* sob a presença de concentrações altas de metais, os resultados demonstraram um aumento significativo do RNA mensageiro de todas as 3 Prxs com o passar do tempo de exposição destes organismos à Cu, Cd e Zn, sendo que em Cd e Cu houve um grande aumento nas primeiras 48h de experimento para a Prx 2. Assim como, em bivalves, Trevisan (2014) expos *Perna perna* à várias concentrações de peróxidos, demonstrando que até certa dose de contaminação por peróxidos, as Prxs funcionavam como algumas das mais rápidas e principais enzimas de resposta à peroxidação no citosol e mitocôndrias. Logo, estes experimentos condizem com a possibilidade da diminuição das atividades das enzimas GST e GPx se dever à ativação de outras vias de depuração.

Da mesma forma, de Oliveira et al. (2018) realizaram um experimento com a espécie nativa *Anodontites trapezialis* e observaram que a atividade de GST pode ser diminuída quando o animal fica exposto à altas concentrações de Mn (5 mg/L) nas glândulas digestivas, levando a hipótese de que o Mn possui um grande potencial de supressão metabólica nestes animais bivalves, sendo vista já uma supressão na GST com concentrações de 0,5 mg/L de Mn. Demais estudos em *C. fluminea* indicam que

os órgãos destes organismos possuem uma alta especificidade de respostas à metais, sendo as brânquias um dos órgãos mais afetados pela bioacumulação (Guo, 2018).

Conforme Miserazzi et al. (2020) a espécie *C. fluminea* quando exposta à amostras de óleo pode acionar estratégias de defesa quando estão expostos à um ambiente contaminado, sendo exemplos a menor abertura de valvas e o comportamento de “catch”, que seria a manutenção das valvas completamente fechadas por um período maior de tempo, impedindo-os de ingerir mais sedimentos contaminados e assim, ter menos contato com os metais presentes no meio, o que pode também ser uma explicação à diminuição da atividade das enzimas (GST e GPx) enquanto há o aumento dos metais. Além disso, diversos trabalhos demonstram que estes animais realizam uma mudança comportamental quando em um ambiente contaminado por metais em elevadas concentrações, como redução de seu metabolismo, desta forma também diminuindo seu consumo de oxigênio e realizando o fechamento das valvas (Liao et al. 2005; Ortmann and Grieshaber, 2003). Embora comportamento e metabolismo energético não tenham sido avaliados, os estudos mencionados mostram que *C. fluminea* dispõem de mecanismos para tentar reduzir a exposição aos agentes estressores, como poluentes. Porém Liao et al. (2005) também indica que há um nível de “dose- resposta” do contaminante para tal comportamento, o que evidencia que a capacidade de evitar a contaminação é limitada.

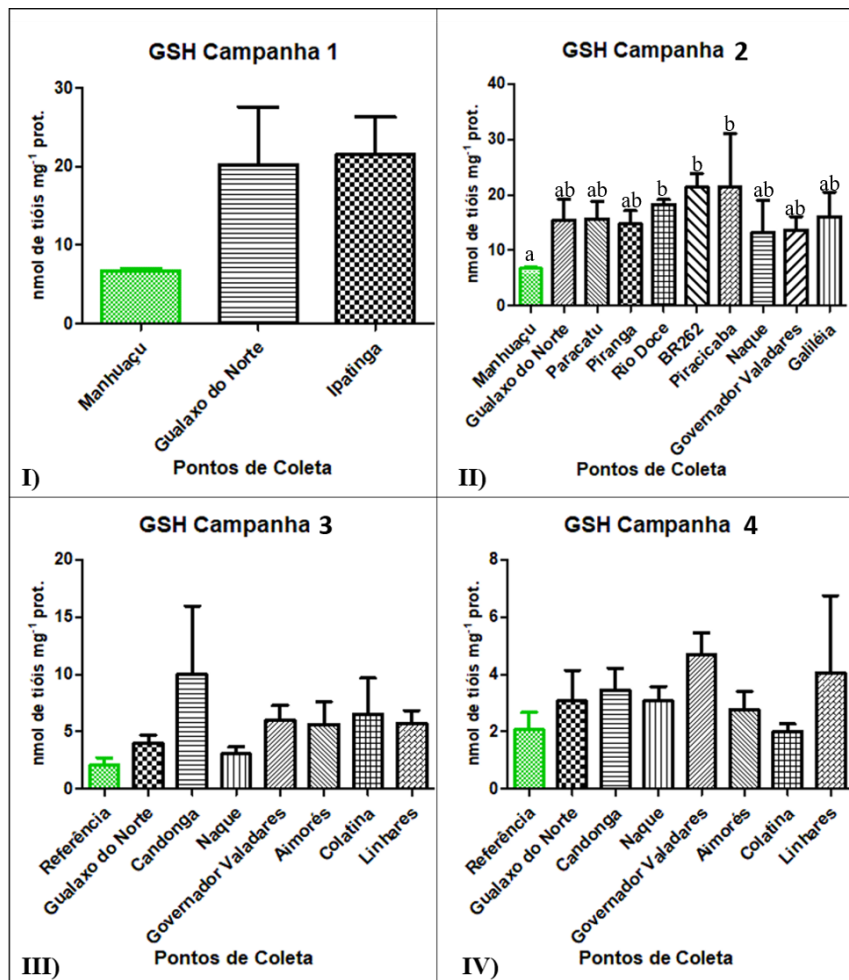


Figura 7 - Em GSH, os pontos de coleta em cada campanha. Em verde é observado o ponto considerado controle de cada gráfico, assim como na campanha 2, é possível observar as diferenças significativas ordenadas por letras. No canto inferior esquerdo dos gráficos I) se refere à Campanha 1, II) Campanha 2, III) Campanha 3 e VI) Campanha 4.

A atividade da GSH apresentou diferença significativa entre os pontos de amostras da campanha 2, um ano após o desastre, onde os pontos Rio Doce, Piracicaba e BR262, os dois primeiros pertencentes ao Alto e o último ao Médio Rio Doce, apresentaram os pontos maior atividade da enzima. Porém é importante notar que nas demais campanhas houve um aumento visualmente significativo em relação ao controle, como os pontos Gualaxo do Norte e Ipatinga na campanha 1 com valores superiores ao dobro do controle, assim como os pontos Candonga, Governador Valares, Aimorés, Colatina e Linhares na campanha 3, observando-se em Candonga valores superiores ao triplo do controle. A campanha 2 foi realizada aproximadamente 1 ano após o rompimento da barragem, desta forma a diferença estatística observada nas amostras dos pontos Rio Doce, BR262 e Piracicaba com o controle pode explicada pelo assentamento dos sedimentos contaminados durante a estação seca anterior à coleta, onde a maior parte dos contaminantes passaram da coluna d'água para o sedimento e deu início à fase crônica de toxicidade dos organismos expostos (Sá et al., 2021).

Ainda com relação as atividades altas dos biomarcadores comparados ao controle das campanhas em alguns pontos, estes resultados podem ser devidos também aos contaminantes orgânicos pontuais, como é possivelmente o caso de Governador Valadares, já que esta apresentou altas concentrações para muitos metais, como As, Cd, Cr, Ni e Al, possuindo também, segundo o encarte da ANA (2016), contaminação por efluente doméstico, junto com Colatina e Linhares. De Souza et al. (2022) cita em seu trabalho sobre a presença de poluentes orgânicos persistentes (POPs) no Rio Doce, que mesmo os que foram avaliados não terem apresentando concentrações que aparentam oferecer risco ecológico, há possivelmente uma influência sazonal na dispersão e concentração destes poluentes. Ainda com relação aos efeitos dos orgânicos. Cheung et al. (2002) analisou a resposta de moluscos bivalves da espécie *Perna viridis* à Hidrocarbonetos Clorados em ambiente controlado, onde estes apresentaram uma indução de GSH e GST em concentrações-traço do poluente, sendo estas consideradas antioxidantes pouco específicos, ainda no estudo é considerado que no ambiente natural, os comportamentos destes hidrocarbonetos podem ser diferentes pela presença de outros contaminantes.

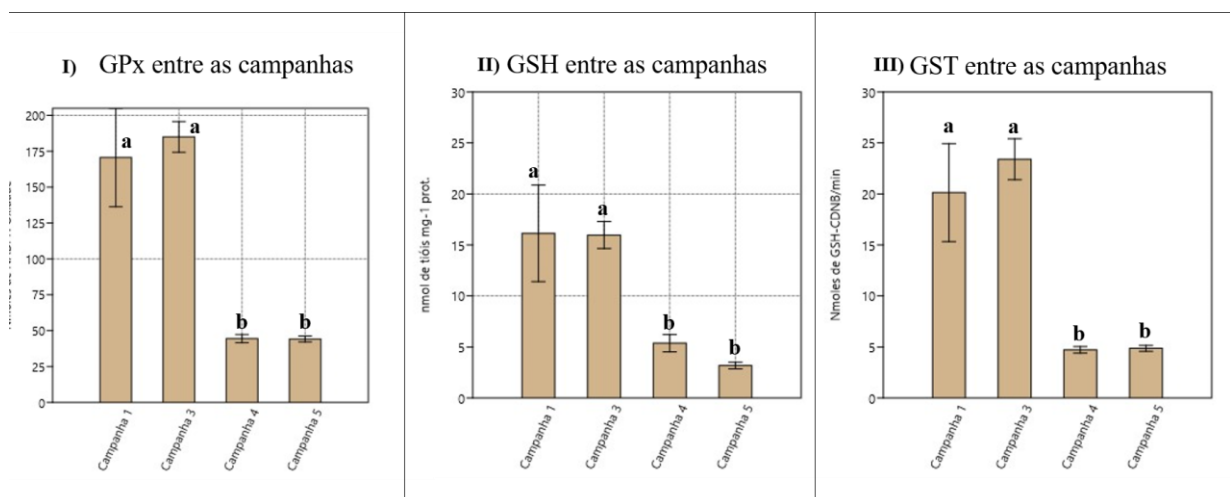


Figura 8 - Análise comparativa dos biomarcadores entre as campanhas. Em I) GPx, II) GSH e III) GST, sendo as diferenças significativas em cada gráfico demonstradas pela letra a) e b).

Ao realizar uma comparação entre as campanhas de cada biomarcador, ao analisar a figura 8, nota-se uma diminuição da atividade dos mesmos. Segundo a análise realizada a partir da estatística de Kruskal-Wallis entre as campanhas, não houve diferença significativa entre as campanhas 1 e 2 e nem entre 3 e 4, porém foi observada diferença estatística das campanhas 1 e 2 com as campanhas 3 e 4, para as atividades tanto de GSH quanto GST e GPx, o que nos permite afirmar que houve uma diminuição significativa da atividade dos biomarcadores com o passar do tempo. Porém com relação à GSH, mesmo obtendo valores de diminuição estatisticamente significativos, é possível notar na figura 7 que permaneceu aumentada em muitos pontos durante as campanhas, principalmente em comparação ao

controle. Esse resultado pode estar relacionado com o aumento geral dos metais no sedimento a partir da campanha 3, como pode ser visto pela tabela 2.

Ainda, é possível visualizar tanto na figura 8 quanto nas figuras 5, 6 e 7 que nas campanhas 1 e 2 as enzimas e a GSH estão em concentrações altas e com diferenças em relação ao controle, mesmo que em geral não haja diferenças estatisticamente significativas. Isso pode ser explicado pelo aumento da defesa dos organismos aos xenobióticos, no caso principalmente defesa aos metais que além de serem responsáveis pela formação de ERO, também podem agir de forma direta com as enzimas GST e GPx e com a GSH, levando ao funcionamento deste sistema antioxidante, como visto por Camargo (2018) e Farombi et al. (2007). Porém a partir da campanha 3 houve a diminuição de GPx e GST, sendo esse possivelmente um resultado tanto pelo "esgotamento" da defesa antioxidante devido ao aumento da concentração de metais em todos os pontos do rio, como também à ativação de vias como as da Peroxirredoxina, Superóxido Desmutase, Catalase e Metalotioneína (Camargo, 2018; Farombi et al., 2007; Bonnail et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Trevisan, 2014).

Assim, devido a continuidade das atividades de GST e GPx nas duas últimas campanhas onde há altos níveis de metais como Al, Cd e Fe, junto da concentração alta de GSH em alguns pontos quando comparados ao controle. É possível que este sistema antioxidante se manteve ativo e depurando os metais em diversos pontos de coleta, porém o aumento de metais em si possivelmente levou à ativação das demais estratégias de defesa por estes animais, como o aumento da produção de muco e a transferência destes metais para serem usados em demais estruturas, como as conchas, estratégias vistas por Oliveira et al. (2018), porém não realizada neste trabalho, e o aumento da concentração de Metalotioneína, analisada por outro trabalho ainda não publicado realizado pelo nosso grupo de pesquisa.

Bigot et al. (2010) realizaram um experimento avaliando a taxa de transcrição de diversos biomarcadores em *C. fluminea* expostos à água contaminada com diversas concentrações de Cu e Cd, assim como a mistura destes dois componentes em duas concentrações (10 e 50 ug/L de cada) por 12h. Os resultados corroboram com a diminuição da atividade de GPx e GST em resposta do aumento das concentrações de metais, pois quando os indivíduos foram expostos de 50ug/L de Cu, assim como Cd, estes apresentaram uma queda na expressão de mRNA das enzimas em brânquias.

Além disso, é importante ressaltar que diversos estudos mostram que os metais afetam outros biomarcadores além de GST, GSH e GPx, sendo exemplo o decréscimo de atividade das enzimas Superóxido Desmutase (SOD) e Catalase (CAT) com a exposição prolongada ao Cd, assim como da AChE quando exposta a concentração de 2mg/L de Cu por uma semana (Macías-Mayorga et al., 2015; Bonnail et al., 2016). Logo, a alta concentração de metais nos sedimentos do Rio Doce (alguns acima da legislação) pode vir a causar demais interferências.

Correlação Linear de Pearson

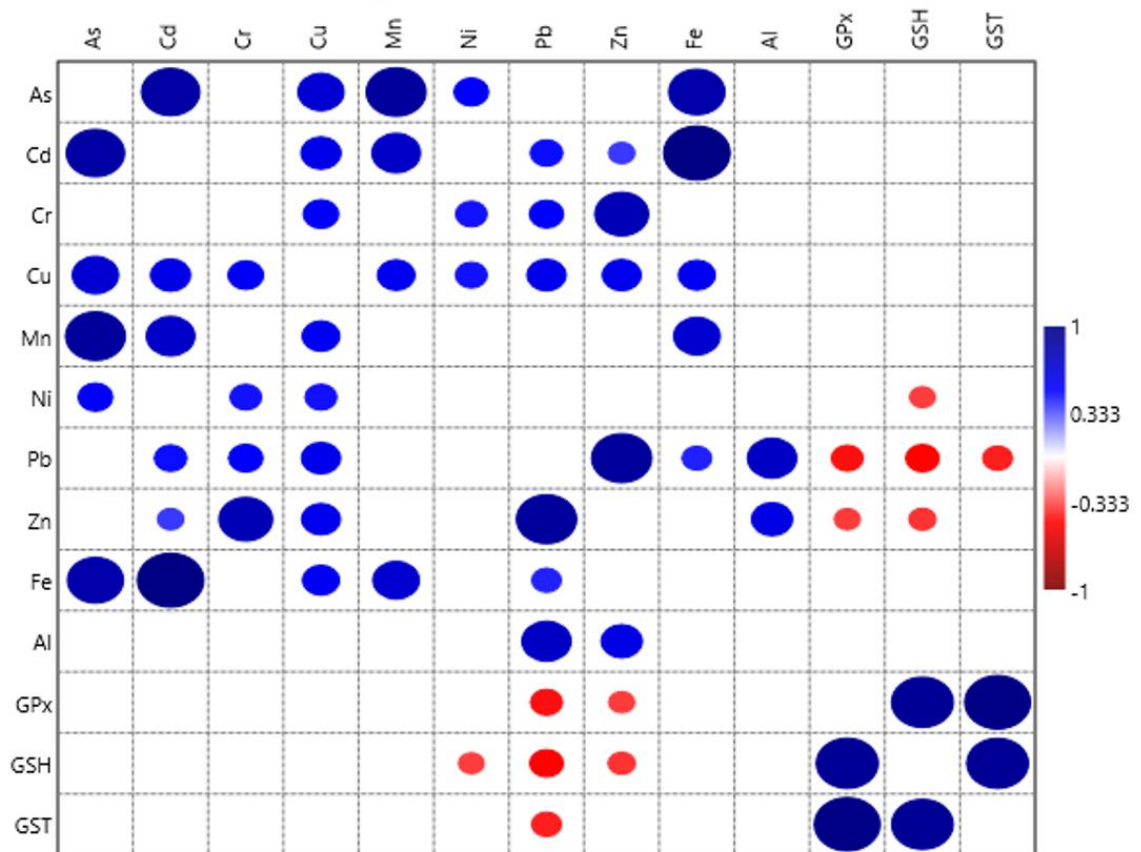


Figura 9 – Representação gráfica das correlações observadas entre os metais presentes no sedimento e os biomarcadores estudados. Em azul está sendo mostrada a correlação positiva, assim como são apresentadas em vermelho as correlações negativas. Quanto maior a área circular, maior o valor de R, sendo portanto, uma correlação mais significativa.

A Figura 9, assim como a Tabela 3 abaixo com os respectivos valores de p e R, mostram os resultados obtidos ao realizar uma correlação linear de Pearson entre os metais e os biomarcadores analisados neste trabalho. Nota-se a correlação positiva entre diversos metais como Zinco (Zn)/Chumbo (Pb) e Manganês (Mn)/Arsênio (As), assim como entre os biomarcadores apresentados, GPx, GSH e GST. Também é importante observar a correlação negativa apresentada entre os biomarcadores e alguns metais específicos, mesmo que numericamente estas tenham sido baixas, com valores de R menores, porém próximos de 0,5, principalmente para Chumbo (Pb).

O Cadmio, mesmo não apresentando correlação com a GSH e as enzimas GST e GPx neste trabalho, segundo Arini (2014), é necessário mais do que um ano de depuração para que este seja ajustado pelo *C. fluminea*, já que em um ano apenas 73% do metal acumulado foi eliminado pela espécie, mesmo estando exposta durante a depuração à um ambiente laboratorial de água e sedimentos sem contaminação, mostrando que os metais possuem diferentes taxas de depuração pelos animais.

Foi visto por Oliveira et al. (2018) os metais possuem efeitos aditivos e antagônicos entre si quando em mistura, como a relação antagônica de Zn com Fe, sendo o primeiro um antioxidante para o segundo. Porém ao se observar a tabela de correlação neste trabalho, não é possível ver efeitos antagônicos, assim como também de alguns metais descritos na literatura como importantes poluentes para esses animais e estes biomarcadores, como é o caso do Cd. Isso se deve possivelmente às baixas concentrações de alguns metais como Zn e Cu, principalmente quando comparados com aqueles pertencentes a pluma de rejeitos liberada, como o Fe e o Al, os quais tiveram apenas tendência de aumento, tanto por estarem presentes em concentrações extremamente altas desde o desastre quanto por serem ressuspendidos do sedimento durante períodos de chuva (Sá et al., 2021; Reis et al., 2019).

A contaminação pelas altas concentrações de Fe pode ter gerado ERO, porém possivelmente o fato deste ser um metal essencial com diversos mecanismos de regulação pelos animais quando em baixas concentrações no ambiente e o aumento do Zn com o passar do tempo, assim como as altas concentrações de Mn nas campanhas podem ter impedido uma participação maior do Fe na produção das espécies reativas (Oliveira et al., 2018; Alfnas et al., 2010; Sá et al., 2021).

Tabela 3 – Valores numéricos das correlações lineares de Pearson entre metais e biomarcadores GSH, GST e GPx. Sendo os números apresentados em cima valores de $p(> 0,05)$ enquanto os representados abaixo valores de R. Para uma melhor compreensão dos dados foram coloridas de azul as correlações positivas acima de 0,50, enquanto de vermelho as correlações negativas maiores de 0,40 entre os biomarcadores e os metais, sendo essas correlações baixas, porém com bons valores de p.

	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al	GPx	GSH	GST
As		1,13E-08	0,67	0,00	1,46E-09	0,01	0,40	0,62	1,10E-07	0,74	0,39	0,28	0,34
Cd	0,86		0,22	0,00	1,99E-05	0,24	0,01	0,04	2,59E-19	0,43	0,13	0,14	0,13
Cr	0,09	0,24		0,00	0,47	0,01	0,01	6,09E-07	0,24	0,30	0,08	0,14	0,13
Cu	0,68	0,59	0,52		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,16	0,10	0,09	0,12
Mn	0,88	0,71	-0,14	0,55		0,41	0,68	0,69	6,56E-05	0,65	0,82	0,63	0,76
Ni	0,51	0,23	0,46	0,47	0,16		0,34	0,10	0,30	0,83	0,14	0,05	0,11
Pb	0,17	0,48	0,50	0,57	0,08	0,19		3,92E-10	0,02	1,33E-05	0,01	0,01	0,02
Zn	0,10	0,39	0,79	0,57	-0,08	0,32	0,89		0,06	0,00	0,04	0,04	0,09
Fe	0,83	0,98	0,23	0,54	0,68	0,20	0,43	0,36		0,53	0,12	0,13	0,12
Al	-0,07	0,16	0,20	0,27	-0,09	0,04	0,72	0,60	0,13		0,24	0,14	0,27
GPx	-0,17	-0,29	-0,34	-0,31	-0,04	-0,29	-0,47	-0,38	-0,30	-0,23		1,72E-11	2,91E-17
GSH	-0,22	-0,29	-0,28	-0,33	-0,10	-0,38	-0,49	-0,40	-0,30	-0,28	0,91		2,88E-11
GST	-0,19	-0,30	-0,29	-0,30	-0,06	-0,31	-0,44	-0,33	-0,30	-0,22	0,97	0,91	
Valores de R													

Valores de $p < 0,05$

5. Conclusão

A partir das informações geradas neste trabalho em conjunto com aquelas contidas na literatura, é possível afirmar que os metais presentes na Bacia Hidrográfica do Rio Doce decorrentes do rompimento da barragem do Fundão tenham afetado os moluscos bivalves presentes naquela localidade, não apenas no momento do acidente, como também com o passar dos anos.

Com relação ao aumento dos metais com o tempo, o comportamento é possivelmente associado ao ambiente, principalmente pela dinâmica do fluxo do rio de períodos chuvosos e secos, além do comportamento da decantação dos rejeitos lamosos em si. Já com relação aos biomarcadores, o trabalho demonstrou que houve relação com os metais, aumentando as GSH, GPx e GST em menores concentrações de metais no ambiente e diminuindo as mesmas em ambiente muito contaminado, mostrando que os metais possam ter ativado demais vias, assim como diminuído parte das enzimas GST e GPx destes organismos nas campanhas 3 e 4.

Também foi possível perceber que na campanha 4 houveram contaminações mais específicas e localizadas, algumas referentes até mesmo mais à atividades locais do que a lama de rejeitos em si, mostrando a influência da época do ano nos resultados (inverno seco).

Além disso foi visto nesse trabalho que é possível que os resultados de biomarcadores estejam sendo influenciados também por demais contaminantes, como orgânicos e mercúrio, não estudados neste trabalho, assim como por comportamentos que diminuem a exposição aos contaminantes, como o “catch”, porém, pelos resultados apresentados, pôde-se observar que estes animais estão sendo capazes de depurar e imobilizar ao menos parte dos metais aos quais estão sendo expostos pelo ambiente, seja em partes devido as diversas vias de depuração que possuem, incluindo a da GSH.

Como o trabalho é realizado com amostras de sedimentos, há uma contaminação de diversos metais, o que revela a complexidade do ambiente e da contaminação sofrida pelos animais ali expostos.

Por fim, mesmo que este trabalho tenha mostrado a importância destes organismos como modelo para avaliação de impactos dos sedimentos contaminados para a biota, além de revelar a necessidade de um monitoramento às concentrações dos metais na localidade mesmo passado anos do rompimento da barragem, para se obter uma visão mais abrangente da situação dos bivalves expostos ao sedimento da Bacia Hidrográfica do Rio Doce a partir do ano do rompimento da barragem do Fundão até anos após o desastre, será necessária durante a continuidade desta pesquisa, a realização de uma comparação dos biomarcadores expostos neste trabalho com os demais que ainda estão sendo analisados.

6. Referências Bibliográficas

- Abessa, DMS. 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.
- Alfnas, G. F. Variação espacial e temporal da assembléia de macroinvertebrados aquáticos em um ecossistema aquático preservado de Mata Atlântica. 2010. Dissertação (Mestrado em Ecologia)— Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010. Acesso em 28/ de Nov. de 2019 pelo link: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/2653>
- 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. Informe 2015. Brasília DF: Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos (SPR), Ministério de Meio Ambiente. Brasil.
- Arini A, Daffeb G, Gonzalezb P, Feurtet-Mazela A, Baudrimont M (2014) Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): a one-year depuration experiment. *Environ Pollut* 192:74–82
- Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfnas, R. de C. G.; De Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição, Campinas*, n. 23, v. 4, p. 629-643, 2010.
- Bigot, A., Mínguez, L., Giambérini, L., Rodius, F., 2010. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies. *Environ. Toxicol.* (DOI 10.1002/ tox.20599).
- Bonnail E, Buruaem LM, Araujo GS, Abessa DM, Del Valls TA (2016) Multiple biomarker responses in *Corbicula fluminea* exposed to copper in laboratory toxicity tests. *Arch Environ Contam Toxicol* 2(71):278–285
- Burton, G. J.; Jauniaux, E. Oxidative Stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010, 25: 287-299.
- Camargo, M. M. P. & C. B. R. Martinez. 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21: 61-69.
- Camargo, J.B.D.A. Efeitos biológicos da contaminação sobre bivalves filtradores de regiões do litoral de São Paulo, com ênfase na Baixada Santista. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Oceanografia, São Paulo, 2018. Acesso em 22 de Maio de 2020 pelo link <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21134/tde-11022019-165619/en.php>
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67–76.
- 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. Coral growth bands recorded trace elements associated with the Fundão dam collapse, *Science of The Total Environment*, Volume 807, Part 2, 2022, 150880, ISSN 0048-9697, <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.* <http://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.06.002>
- Cheung, C.C.C., Zheng G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue

- concentrations of chlorinated hydrocarbons polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 45 (1–12), PII: S0025-326X(01)00301-0
- CDHM - Comissão de Direitos Humanos e Minorias. Relatório. Diligência a comunidades no Espírito Santo atingidas pelo Rompimento da Barragem de Mariana. Câmara dos Deputados. 2019.
- 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_2012_materialserdragadoemaguasjurisdicionaisbrasileiras.pdf Consórcio Ecoplan Lume . 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. Relatório. 2010.
- Damáσιο, J., Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D., Soares, A.M.V., López, M.A., Riva, M.C., Barata, C., 2010. Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology* 19, 1084–1094.
- De Oliveira, L.F., Cabral, M.T., Risso, W.E., dos Reis Martinez, C.B., 2018. Single and combined effects of Zn, Mn and Fe on the Neotropical freshwater bivalve *Anodontites trapesialis*: bioaccumulation and biochemical biomarkers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 735–745. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.029>.
- De Souza AC, Cabral AC, Silva JD, Neto RR, Martins CC (2022) Low levels of persistent organic pollutants in sediments of the Doce River mouth, South Atlantic, before the Fundão dam failure. *Sci Total Environ.* 802:149882
- Drago, L.; Ferro, D.; Bakiu, R.; Ballarin, L.; Santovito, G. Typical 2-Cys Peroxiredoxins as a Defense Mechanism against Metal-Induced Oxidative Stress in the Solitary Ascidian *Ciona robusta*. *Antioxidants* 2022, 11, 93. <https://doi.org/10.3390/antiox11010093>
- Ekelund Ugge GMO, 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 Res* 27:9999–10010
- Espindola, H. S.; Nodari, E. S.; Santos M. A. Rio Doce: riscos e incertezas a partir do desastre de Mariana (MG) Rio Doce: Risks and Uncertainties of the Mariana Disaster (MG). 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-93472019v39n81-07> .
- Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int J Environ Res Public Health.* 2007; 4(2):158-65.
- Fernandes, G.W.; Goulart, F.F.; Ranieri, B.D.; et al. Deep into the mud: ecological and socio- economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil *Nat. Conserv.*, 14. 2016. pp. 35-45
- Ferreira FF, Freitas MBD, Szinwelski N, Vicente N, Medeiros LCC, Schaefer CEGR, Dergam JÁ, Sperber CF. 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.
- Fontes, M. K. Avaliação do Risco Ambiental do Fármaco Diclofenaco em Ambientes Marinhos. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa Interunidades de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada, Instituto de Ciências Ambientais Químicas e

- Farmacêuticas e Instituto de Mar, Universidade Federal de São Paulo, Câmpus Diadema/Baixada Santista, 2016.
- Fundação Renova. Relatório Técnico. Avaliação dos Resultados de Sedimentos do Rio Doce - Atualização de Julho de 2017, RT-046_159-515-2282_00-B, 2017.
- Fundação Renova. Relatório. Programa de Monitoramento Quali-Quantitativo Sistemático de Água e Sedimentos - PMQQS: Relatório Trimestral Simplificado - Maio 2019, 2019.
- 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>.
- Gomes, M.P.; Brito, J.C.M.; Vieira, F.; Kitamura, R.; Juneau, P. Emerging contaminants in streams of Doce river watershed, Minas Gerais, Brazil. *Front. Environ. Sci.* 2022, 9, 801599
- Gouveia, S. S.; Lima, A. A. (2017) Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica: Inert relationship between reactive species of oxygen and carcinogenic promotion. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*, Vol.20,n.3,pp.174-179.
- 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* 638 631–632, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.019>
- Huber, P. C.; Almeida, W. P.; Fátima, A. de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, n. 05, p. 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.
- Instituto Mineiro De Gestão Das Águas - IGAM. Encarte Especial sobre a Qualidade das Águas do Rio Doce após 4 anos do Rompimento da Barragem de Fundão 2015-2019. 2020.
- Jain, K. *The Hand Book of Biomarkers*. (Springer, New York, 2010).
- Klimova, Y.S., Chuiko, G.M., Gapeeva, M.V., et al., The use of oxidative stress parameters of bivalve mollusks *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) as biomarkers for ecotoxicological assessment of environment, *Inland Water Biol* .., 2019, vol. 12, p. 88. <https://doi.org/10.1134/S1995082919060063>
- Kucuksezgin, F., Kayatekin, B.M., Uluturhan, E., Uysal, N., Acikgoz, O. et al., 2008. Preliminary investigation of sensitive biomarkers of trace metal pollution in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Izmir Bay (Turkey). *Environmental Monitoring & Assessment*, 141 (1-3), 339-345.
- Liao, C. M., Jou, L. J., & Chen, B. C. (2005). Risk-based approach to appraise valve closure in the clam *Corbicula fluminea* in response to waterborne metals. *Environmental Pollution*, 135, 41–52.
- Lima, Higor Suzuki. Qualidade das águas superficiais da porção mineira da Bacia do Rio Doce sua relação com aspectos socioambientais. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos)—Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016. Acesso em 28 de Out. de 2019 pelo link: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AAHGE4>.
- Lopes, L.M.N. 2016. O rompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais. *Sinapse Múltipla*, 5(1): 1-14.
- Macías-Mayorga, D., Laiz, I., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., 2015. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the mollusc *Crassostrea angulata*? *Aquat. Toxicol.* 161,231–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.007>.

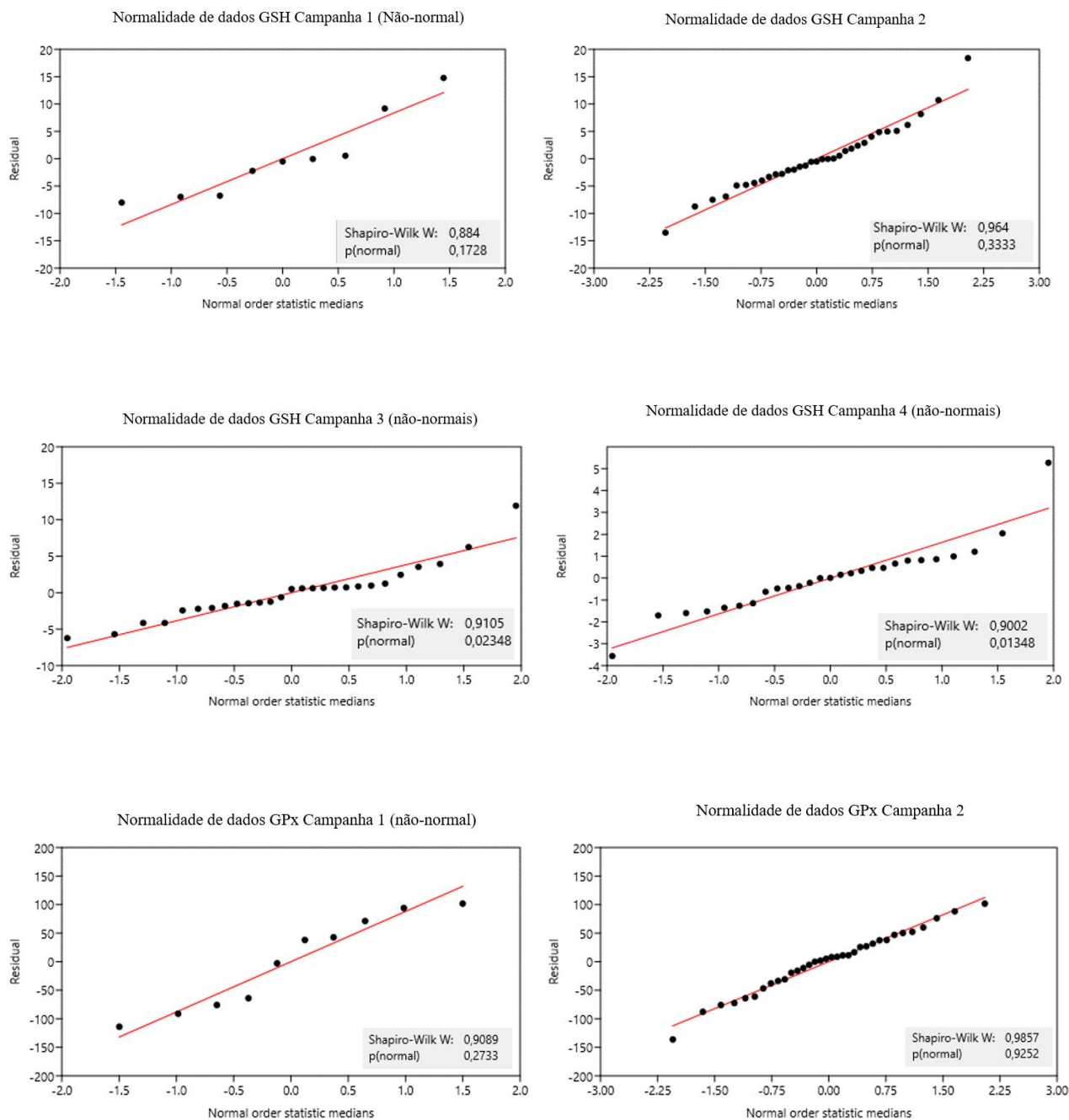
- Magalhães and Ferrão-Filho, 2008 D.P. Magalhães, A.S. Ferrão-Filho A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos Oecologia Bras., 12. 2008. pp. 355-381.
- Maranho LA, Pereira CDS, Choueri RB et al (2012) The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys. J Environ Monit 14:2608–2615. doi:10.1039/c2em30465a
- Marques, J. A. Múltiplos estressores em recifes de coral: respostas fisiológicas de organismos calcificadores. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande (FURG). 2019.
- Marques, M. M., and F. A. R. Barbosa. 2001. Biological quality of waters from an impacted tropical watershed (middle Rio Doce basin, Southeast Brazil) using benthic macroinvertebrate communities as an indicator. Hydrobiologia 457:69–76.
- Marangoni, N. G.; Klosowski, E. S.; Oliveira, K. P.; Chambo, A. P. S.; Junior, A. C. G. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. Química Nova, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000300002>
- Mazzei, E. F., Bertocini, 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, 0–2. <https://doi.org/10.1002/ieam.4291>
- Miranda, L. S. & Marques, A. C. Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna – an example from the staurozoans (Cnidaria). Biota Neotropica 16:e20160169. 2016.
- Miserazzi, A.; Perrigault, M.; Sow, M.; Gelber, C.; Ciret, P.; Lomenech, A.M.; Dalens, J.M.; Weber, C.; Le Floch, S.; Lacroix, C.; et al. Proteome changes in muscles, ganglia, and gills in *Corbicula fluminea* clams exposed to crude oil: Relationship with behavioural disturbances. Aquat. Toxicol. 2020, 223, 105482.
- Oliveira, K.S.S., Quaresma, V. da S., 2017. Temporal variability in the suspended sediment load and streamflow of the Doce River. J. S. Am. Earth Sci. 78, 101–115.
- Okusa MD, Jaber BL, Doran P, Duranteau J, Yang L, Murray PT, Mehta RL, Ince C : Physiological biomarkers of acute kidney injury: A conceptual approach to improving outcomes. Contrib Nephrol 182: 65–81, 2013pmid:23689656
- Ortmann, C., Grieshaber, M.K., 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. J. Exp. Biol. 206, 4167–4178.
- Parra, S.; Varandas, S.; Santos, D.; Félix, L.; Fernandes, L.; Cabecinha, E.; Gago, J.; Monteiro, S.M. Multi-biomarker responses of Asian clam *Corbicula fluminea* (bivalvia, corbiculidea) to cadmium and microplastics pollutants. Water 2021, 13, 394.
- Pina, B., Casado, M., Quirós, L., 2007. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. Trends Anal. Chem. 26, 1145–1154.
- Pires, J. M. M., Lena, J. C., de, Machado, C. C. & Pereira, R. S. Potencial poluidor de resíduo sólido da

- Samarco Mineração: Estudo de caso da barragem de Germano. *Rev. Árvore* 27, 393–397 (2003).
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000300017>
- 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.
- Puntmann, V.O. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease, *Postgrad Med J*, 2009, vol. 85 (pg. 538-545)
- Queiroz, H. M., Ruiz, F., Deng, Y., de Souza Júnior, V. S., Ferreira, A. D., Otero, X. L., Camêlo, D. L., Bernardino, A. F., Ferreira, T. O. (2022). Mine tailings in a redox-active environment: Iron geochemistry and potential environmental consequences. *Science of The Total Environment*, 807, 151050.
- Queiroz, H.M., Ying, S.C., Bernardino, A.F., Barcellos, D., Nobrega, G.N., Otero, X.L., Ferreira, T.O., 2021c. Role of Fe dynamic in release of metals at Rio Doce estuary: unfolding of a mining disaster. *Mar. Poll. Bull.* 166, 112267, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112267>.
- Rand, G, M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment* (Taylor & Francis, Washington, DC, ed. 2, 1995), pp. 54–55.
- Reis, D. A., Roeser, H. M. P. & Santiago, A. F. (2019). Impacto ambiental nos sedimentos do tributário do Rio Doce após o rompimento da barragem de Fundão. *Research, Society and Development*, 9 (2): e01921895.
- 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>
- 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.
- Rover Jr L, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova*. 2001; 24(1): 112-9.
- Sá, F., Longhini, C.M., Costa, E.S., da Silva, C.A., Cagnin, R.C., Lima, A.T., Bernardino, A.F., Neto, R.R., Gomes, L.E.de O., 2021. Time-sequence development of metal(loid)s following the 2015 dam failure in the Doce river estuary, Brazil. *Sci. Total Environ.* 769, 144532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144532>.
- Santonen T, Aitio A, Fowler BA, Nordberg M.2014. Biological monitoring and biomarkers. In *Handbook on the Toxicology of Metals*, 4th Ed. Vol. 1: General Considerations (Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, eds). New York:Academic Press/Elsevier, 155–171.
- 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.
- Silva, M. U. Efeitos da exposição aguda ao selênio e ao cobre sobre as defesas antioxidantes de mexilhões marinhos *Perna perna*. 2010. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. Acesso em 22 de Maio de 2020 pelo link:<<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/132553>>
- Sogorb, M.A.; Estévez, J.; Vilanova, E. Chapter 57—Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics. In *Biomarkers in Toxicology*; Gupta, R.C., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2014; pp. 965–973.
- Spann, N.; Aldridge, D.C.; Griffin, J.L.; Jones, O.A.H. 2011. Size-dependent effects of low level

- cadmium and zinc exposure on the metabolome of the Asian clam, *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol.* 105(3–4): 589–599. doi:10.1016/j.aquatox.2011.08.010. PMID:21946168.
- Thomé, J. A.; De Martini, E. A.; Junior N. O. L. 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., 2016, Santa Teresa, Brasil, Anais, p.34-48, 2016. Acesso em 01 de Julho de 2020 pelo link: <http://tamar.com.br/publicacoes_html/pdf/2016_Avaliacao_inicial_dos_impactos_da_pluma_de_rejeitos.pdf >
- Trevisan, R., Mello, D.F., Uliano-Silva, M., Delapetra, G., Arl, M., Dafre, A.L., 2014. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. *Mar. Environ. Res.* 101, 81–90.
- USEPA. 1993. Guidance Manual: Bedded Sediment Bioaccumulation Tests. USEPA. Washington DC, EPA/600/R-93/183.
- USEPA. 2000. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second Edition. USEPA. Washington DC. EPA/600/R-99/064.
- USEPA. 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. USEPA, Washington, DC, EPA/823/B-01/002.
- Van der Oost, R., J. Beyer, and N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Phar.*, 13, 57–149, 2003.
- Vervloet, R.J.H.M. 2016. A geomorfologia da região de rompimento da barragem da Samarco: A originalidade da paisagem à paisagem da mineração In: Milanez, B., and Losekann, C., editors, Desastre no vale do Rio Doce: Antecedentes, impactos e ações sobre a destruição. Letra Imagem, Rio de Janeiro. p. 39–90.
- Viana, L.M.S., Pestana, I.A., Carvalho, C.E.V., Salomão, M.S.M.B., 2020. Doce River estuary: geochemical changes following the largest tailing spill in South America. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1–11 <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00766-3>
- 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
- Walker, C. H. (1995). Biochemical biomarkers in ecotoxicology: Some recent developments. *Sci. Tot. Environ.* 171, 189–195.
- World Health Organization (WHO). 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva, Switzerland: WHO.
- 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.
- Zorita, I.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Soto, M. and Cajaraville, M. P., Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study, *Aquat. Toxicol.*, 2006, 78S, S109–S116.
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201-208.

ANEXO I

Teste de Normalidade Shapiro-Wilk



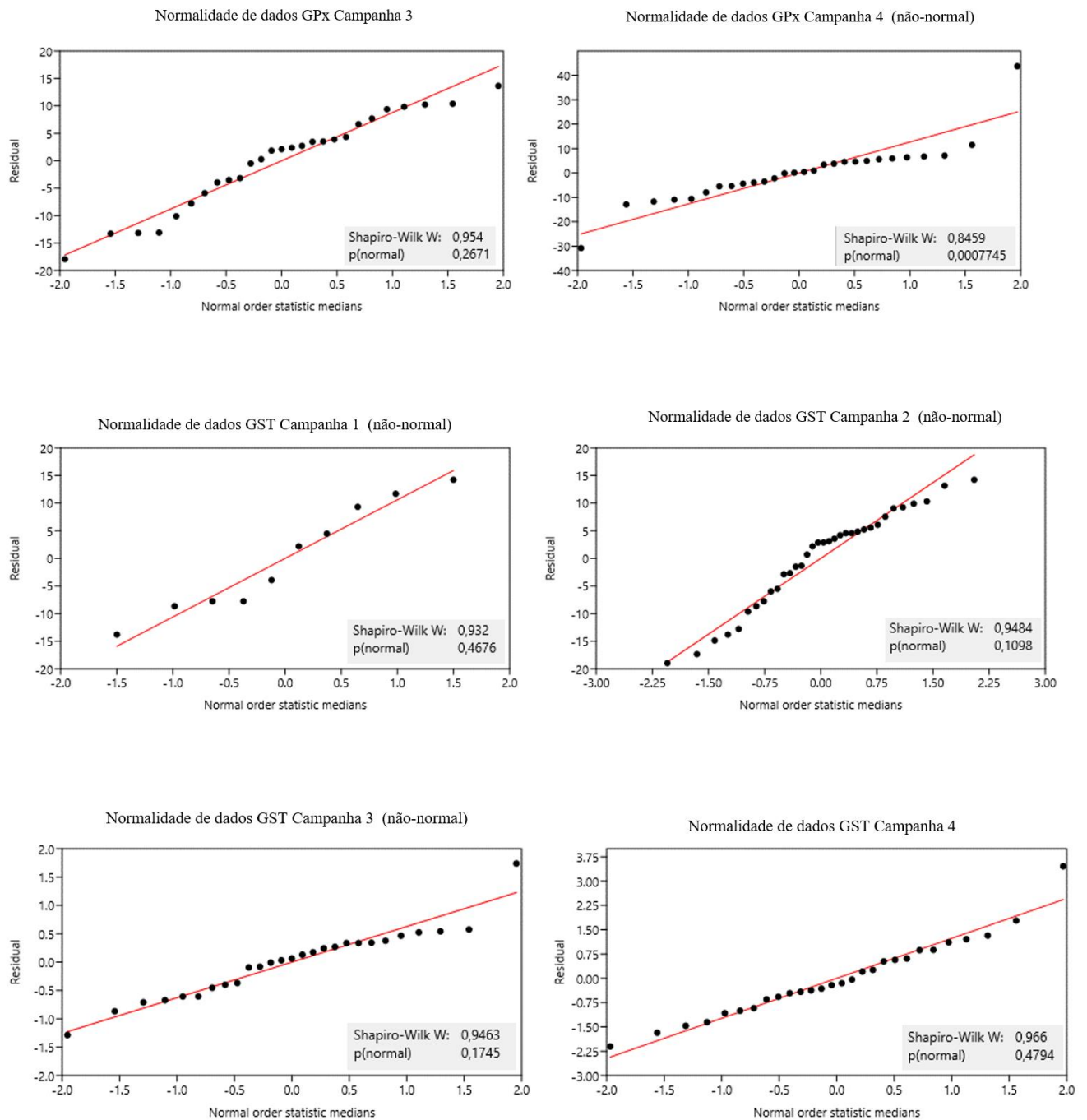


Figura 12 – Retas de Normalidade de Shapiro-Wilk dos valores de biomarcadores para a análises não paramétrica e paramétrica por Kruskal-Walis e Anova de Uma Via, respectivamente. A normalidade foi calculada no programa Past4.03.

ANEXO II

Coordenadas Geográficas (UTM) dos pontos de coleta.

Tabela 4. Abaixo estão apresentados os pontos de coleta ao longo da Bacia do Rio Doce com suas respectivas coordenadas e a nomenclatura de identificação. Sendo separados pontos das campanhas 1/2 e pontos das campanhas 3/4. Na lateral direita é ainda possível visualizar a qual porção do rio Doce os pontos pertencem.

Coordenadas Geográficas das coletas em UTM				
1ª e 2ª Campanha				
Ponto	Referência	Latitude	Longitude	
Gualaxo do Norte	Rio Gualaxo de Norte a montante do despejo (MG)	-20.276388837	-43.431151578	Alto
Paracatu	Rio Gualaxo do Norte em Paracatu de Baixo (MG)	-20.306446685	-43.226204463	
Piranga	Rio Piranga (MG)	-20.37005555	-42.89536111	
Rio Doce	Rio Doce na altura da cidade de Rio Doce (MG)	-20.247805556	-42.886000000	
Piracicaba	Rio Piracicaba (MG)	-19.50922222	-42.541419444	
BR 262	Rio Doce BR 262 entre as cidades de Rio Doce e Ipatinga (MG)	-20.019819000	-42.744726000	
Ipatinga	Rio Doce na altura de Ipatinga	-19.476861111	-42.475972222	Médio
Naque	Rio Doce na cidade de Naque (MG)	-19.236833333	-42.308083333	
Gov. Valadares	Rio Doce na cidade de Governador Valadares (MG) no ponto de captação de água para abastecimento público	-18.883133424	-41.950998621	Ref.
Galiléia	Rio Doce na cidade de Galiléia (MG)	-19.006500000	-41.542527778	
Manhuaçu	Rio usado como Referência, não afetado pelo desastre	-19.497444444	-41.115138888	
3ª e 4ª Campanha				
Ponto	Referência	Latitude	Longitude	
Gualaxo	Rio Gualaxo do Norte no município de Bento Rodrigues	-20,279138888	-43,430611111	Alto
Candonga	UHE de Candonga no Município de Rio Doce	-20,206694444	-42,877694444	Médio
Naque	Rio Doce no município de Naque (MG)	-19,24375	-42,319194444	
Gov. Valadares	Rio Doce em Governador Valadares (MG)	-18,856111111	-41,930416666	Baixo
Aimorés	Rio Doce no município de Baixo Guandu (ES)	-19,506944444	-41,014861111	
Colatina	Rio Doce na cidade de Colatina (ES)	-19,514388888	-40,739361111	Ref.
Linhares	Rio Doce em Linhares (ES)	-19,408388888	-40,0465	
Referência	Rio Corrente em Periquito (MG)	-19,025277777	-42,160361111	

ANEXO III

Tabela de valores de O₂ e pH

Tabela 5 – Resultados iniciais e finais dos parâmetros físico-químicos da água medidos em uma réplica de cada ponto de coleta das campanhas 1, 2, 3 e 4.

Parâmetros físico-químicos da água Campanha 1				
Amostra	Inicial		Final	
	pH	O ₂ (ppm)	pH	O ₂ (ppm)
Gualaxo do Norte	6,88	6,7	7,12	5,88
Ipatinga	6,72	6,3	7,22	6
Parâmetros físico-químicos da água Campanha 2				
Amostra	Inicial		Final	
	pH	O ₂ (ppm)	pH	O ₂ (ppm)
Gualaxo do Norte	6,44	6,8	7,14	5,3
Paracatu	6,88	6,7	7,53	6
Piranga	6,9	6,9	7,41	5,4
Rio Doce	6,54	6,8	7,12	5,9
BR 262	6,71	6,4	7,18	5,6
Piracicaba	6,7	6,8	7,3	5,7
Naque	6,37	6,8	7,63	5,7
Gov. Valadares	6,9	6,8	7,84	5,8
Galiléia	6,3	6,7	7,11	5,2
Parâmetros físico-químicos da água Campanha 3				
Amostra	Inicial		Final	
	pH	O ₂	pH	O ₂
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	7,51	5,22	7,82	4,33
Gov 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
Parâmetros físico-químicos da água Campanha 4				
Amostra	Inicial		Final	
	pH	O ₂	pH	O ₂
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	6,93	6,64	8,02	8,21
Gov 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

ANEXO VI

Metais/Biomarcadores nas amostras sedimentares:

Tabela 6 – Análises de metais presentes nos sedimentos coletados ao longo do Rio Doce (apenas pontos onde houve análise de biomarcadores), sendo que os números apresentados em vermelho estão em discordância com o limite apresentado pela classificação de sedimentos dragados para Classe I do CONAMA 454/2012. Podemos visualizar na coluna de Amostras em vermelho as pertencentes à Campanha 1, em amarelo Campanha 2, Laranja Campanha 3 e Azul Campanha 4, também nota-se que o ponto referência para as campanhas 1 e 2 esta destacado em Verde. As médias dos biomarcadores deste trabalho estão nas colunas em coloração roxa.

Amostras	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn	Fe	Al	GPx	GSH	GST
Classe I CONAMA 454/2012	5,9	0,6	37,3	35,7	-	18	35	123	-	-	-	-	-
Gualaxo do Norte	27,15215	1,7306	13,1901	12,43232	7408,95	7,94506	5,37471	15,88905	48216,15	3802,515	237,6	20,2	28,8
Ipatinga	5,292475	1,08531	29,92295	10,5477	439,544	8,95841	5,500135	24,0544	56340,4	10839,1	150,5	21,5	19,4
Gualaxo do Norte	23,5821	1,22411	12,7874	20,29425	5817,66	8,77754	5,13266	16,21725	80944,65	3850,105	190,2	15,5	23,0
Paracatu	1,2631	0,409465	4,78798	2,78839	261,4805	2,28525	1,654725	8,355525	22551,05	1248,815	191,9	15,7	20,7
Rio Doce	1,70719	0,134857	2,28298	1,55792	72,8713	1,307245	0,631688	5,381095	7971,52	600,879	218,0	18,3	26,8
BR 262	2,317115	0,489153	4,39356	1,688705	61,60045	1,75915	1,70059	6,446675	29020,15	1449,635	177,3	21,4	23,6
Naque	9,17566	0,65436	35,0886	12,08855	236,5165	10,325	9,985055	38,26755	42573,75	30285,75	142,0	15,9	14,9
Governador Valadares	1,93148	0,27395	17,3831	8,44494	112,651	6,513985	4,67526	27,4414	18700,8	9860,365	166,6	13,7	27,3
Galiléia	1,77518	0,0627	9,006325	1,53957	82,0753	2,47337	1,160435	8,060495	4788,29	1816,255	190,6	16,1	28,1
Piranga	1,45081	0,202787	22,26825	7,709755	63,17435	7,757115	3,181335	22,77255	12288,05	7327,32	227,2	14,9	23,6
Piracicaba	3,46571	0,271878	39,9194	5,348265	74,01865	11,25635	4,74183	53,5963	19758,8	6785,445	222,4	21,5	33,8
Manhuaçu	<LQM	0,029074	3,35858	0,976289	1508,075	33,06275	0,563735	0,781125	4,44646	906,003	123,8	6,7	12,2
Gualaxo do Norte	29,06687	1,537226	16,49389	26,98175	12092,05	13,94207	8,916563	18,96417	75634,15	5359,295	38,3	4,0	5,1
Candongá	6,19845	0,711826	18,13886	7,151757	309,09	7,141103	4,837577	17,76888	35743,73	11432,65	36,4	10,0	5,0
Naque	7,575307	0,697103	31,93853	6,339383	348,4788	9,923713	5,861837	25,6958	38465,43	9426,803	40,7	3,1	5,7
Gov. Valadares	3,84189	0,646208	21,26652	6,905755	125,727	6,58863	8,247325	25,19835	20543,51	12434,38	47,6	6,0	5,0
Aimorés	1,974537	0,504434	24,49017	6,819887	256,4092	7,381287	7,73041	26,14373	27520,1	18902,63	57,0	5,6	4,9
Colatina	3,599683	0,29081	14,53458	3,550963	94,35283	5,384373	3,96801	16,8893	17081,36	9258,51	46,1	6,5	2,8
Linhares	3,49264	0,279528	14,9994	4,1639	152,698	6,76206	4,29996	22,0929	16694,2	10172,9	54,5	5,7	4,0
Referência	4,843785	1,387003	24,32337	14,01233	465,2977	7,218987	28,2337	69,58427	71479,63	45528,97	35,2	2,1	5,2
Gualaxo do Norte	47,7646	5,144563	16,37793	14,51055	11373,07	11,31373	12,91919	36,1301	286494,3	4941,46	44,1	3,1	4,0
Candongá	26,7138	1,309947	28,13342	23,03313	1270,566	25,44997	7,38918	38,09103	60587,27	28652,25	43,3	3,5	4,6
Naque	17,39877	1,560695	54,92833	15,95559	1777,69	20,50643	10,56803	50,24247	95912,75	36431,55	43,4	3,1	5,3
Gov. Valadares	13,0496	1,905466	65,61273	22,78353	452,2977	23,2378	20,27	83,2282	82645,3	42707,03	47,6	4,7	4,2
Aimorés	3,152075	0,373242	16,22086	5,231113	105,1374	4,859023	5,407697	20,7648	22167,77	16893,03	33,8	2,8	4,1
Colatina	6,753083	0,717083	37,8667	12,06737	203,69	15,223	10,35586	49,9512	40260,8	39474,6	40,0	2,0	4,9
Linhares	5,13482	0,248729	11,8937	2,555712	92,76797	3,542337	2,95729	11,48261	16145,84	7343,337	53,4	4,1	6,3
Referência	5,903583	1,57955	28,7728	17,2729	718,139	9,298727	32,7028	85,673	75212,55	466555,8	48,0	2,1	5,5

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APRESENTAÇÃO REMOTA

Discente: THAISA RALHA RODRIGUES

Título: “Biomarcadores em *Corbicula fluminea* expostos a sedimentos contaminados do Rio Doce após o rompimento da Barragem do Fundão”

Orientadora: MSC. Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/ Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
MSC. Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly	APROVADA
Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa	APROVADA
Dra. Ana Carolina Feitosa Cruz	APROVADA

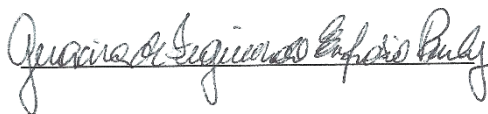
CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Thaís Ralha Rodrigues** obteve o seguinte conceito:

APROVADO

REPROVADO

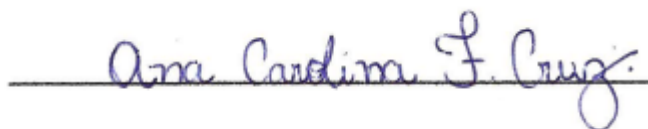
São Vicente, 03 de fevereiro de 2022.



MSC. Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly
 (Orientadora)



Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
 (Co-orientador)



Dra. Ana Carolina Feitosa Cruz