

**ALLAN RODRIGUES PIRES**

**ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS, PERFIL OXIDATIVO E  
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM CINCO ESPÉCIES DE PEIXES DO RIO  
DOCÊ, BRASIL, APÓS O ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves

Coorientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P667a Pires, Allan Rodrigues, 1994-  
2024 Análise das concentrações de metais, perfil oxidativo e  
avaliação histopatológica em cinco espécies de peixes do Rio  
Doce, Brasil, após o rompimento da barragem de Fundão / Allan  
Rodrigues Pires. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (67 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Reggiani Vilela Gonçalves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.352>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peixes - Efeito dos metais pesados. 2. Peixes - Doce, Rio  
(MG e ES) - Histopatologia. 3. Estresse oxidativo. 4. Barragens  
de rejeitos - Mariana (MG). 5. Falhas em barragens - Mariana  
(MG). I. Gonçalves, Reggiani Vilela, 1979-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 571.9543


**ALLAN RODRIGUES PIRES**

**ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS, PERFIL OXIDATIVO E  
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM CINCO ESPÉCIES DE PEIXES DO RIO  
DOCE, BRASIL, APÓS O ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 23 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 ALLAN RODRIGUES PIRES  
Data: 21/07/2024 13:26:18-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

Allan Rodrigues Pires  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 REGGIANI VILELA GONCALVES  
Data: 19/07/2024 11:04:48-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

Reggiani Vilela Gonçalves  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me conceder força, sabedoria e oportunidades ao longo desta jornada. Sem Sua orientação e amparo, nada disso seria possível.

Aos meus amados pais, Gasparino e Valnira, e ao meu querido irmão Renan, expresso minha eterna gratidão pelo amor incondicional, apoio incansável e por serem meu porto seguro em todos os momentos.

À minha família, tios, tias, primos e minha amada avó, especialmente à minha querida tia Leléia, que mesmo após sua partida, sei que continua a me guiar e proteger.

Ao Victor, pela parceria inestimável e pelo apoio constante em todas as etapas deste processo, sua presença foi fundamental.

Aos amigos que encontrei em Viçosa, em especial ao João Pedro, agradeço pelos momentos de descontração e pela amizade verdadeira.

Aos amigos-irmãos, Guidini e Caio, minha gratidão por toda a ajuda e pelos preciosos momentos compartilhados ao longo destes anos.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental (Duda, Filipe, Silvania, Patrícia, Fran, Núbia, Néia, Manu e Lúcia), em especial à Carol, pelo apoio imprescindível durante todo o processo.

Um agradecimento especial à Mariáurea, que mesmo à distância, sempre se mostrou disposta a ajudar.

À minha orientadora Reggiani, pela oportunidade de aprender e crescer profissionalmente a seu lado, sou imensamente grato pela sua orientação e dedicação.

À professora Mariella, por aceitar ser coorientadora deste trabalho, sua contribuição foi fundamental para realização do trabalho.

Ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (LEQ) e ao Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE), pelo suporte nas análises realizadas, gostaria de expressar minha gratidão à Renata e ao Frederico por sua valiosa assistência.

À Universidade Federal de Viçosa, por proporcionar a oportunidade de realizar este percurso na pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais profundo agradecimento por fazerem parte desta conquista.

## RESUMO

PIRES, Allan Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Análise das concentrações de metais, perfil oxidativo e avaliação histopatológica em cinco espécies de peixes do Rio Doce, Brasil, após o rompimento da barragem de Fundão.** Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves.

Após o colapso da barragem de rejeitos em Mariana, em Minas Gerais, no sudeste brasileiro, persistem várias incertezas sobre os impactos a longo prazo desse desastre. Baseado nisto, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do fluxo de lama em cinco espécies de peixes coletadas em diferentes locais do Rio Doce, por meio de análises de concentrações de metais (com foco em 12 metais), perfil oxidativo dos tecidos (incluindo enzimas antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo) e análises histopatológicas. As espécies *Hypostomus affinis*, *Lophiosilurus alexandri*, *Loricariichthys castaneus* e *Hoplias intermedius* mostraram-se mais afetadas em relação aos tecidos branquiais, enquanto *Lophiosilurus alexandri*, *Hypostomus affinis*, *Oligosarcus acutirostris* e *Loricariichthys castaneus* apresentaram os maiores danos no fígado. Dentre todas as espécies testadas, *H. affinis* e *L. alexandri* demonstraram ser as mais vulneráveis aos danos oxidativos e histopatológicos associados às elevadas concentrações de arsênio (As). Em áreas afetadas, os peixes apresentaram uma bioacumulação significativa de arsênio nos tecidos, destacando-se como o metal mais prevalente. Além do arsênio, detectou-se a presença de níquel, ferro e cobre bioacumulados em algumas espécies de peixes coletados nessas áreas. As altas concentrações de arsênio correlacionaram-se positivamente com algumas das histopatologias encontradas, como esteatose hepática e hiperplasia interlamelar nas brânquias. Os resultados deste estudo fornecem uma base para avaliar as novas condições que as espécies se encontram, sendo relevantes para estudos futuros de monitoramento, destacando a importância da continuidade das pesquisas nessa área para uma melhor compreensão e gestão dos ecossistemas afetados.

Palavras-chave: Metais Pesados. Estresse Oxidativo. Barragem de Rejeitos. Histopatologia.

## ABSTRACT

PIRES, Allan Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024.  
**Analysis of metal concentrations, oxidative status, and histopathological evaluation in five species from Doce River, Brazil, after Fundão dam collapse.**  
Adviser: Reggiani Vilela Gonçalves.

After the collapse of the tailings dam in Mariana, Minas Gerais, in the southeastern region of Brazil, several uncertainties persist regarding the long-term impacts of this disaster. Based on this, this study aimed to assess the impact of mudflow on five fish species collected at different locations in the Doce River, through analyses of metal concentrations (focusing on 12 metals), oxidative profile of tissues (including antioxidant enzymes and oxidative stress biomarkers), and histopathological analyses. The species *Hypostomus affinis*, *Lophiosilurus alexandri*, *Loricariichthys castaneus*, and *Hoplias intermedius* were found to be more affected in terms of gill tissues, while *Lophiosilurus alexandri*, *Hypostomus affinis*, *Oligosarcus acutirostris*, and *Loricariichthys castaneus* showed the greatest damage in the liver. Among all tested species, *H. affinis* and *L. alexandri* were found to be the most vulnerable to oxidative and histopathological damage associated with high concentrations of arsenic (As). In affected areas, fish showed significant bioaccumulation of arsenic in tissues, standing out as the most prevalent metal. Besides arsenic, the presence of bioaccumulated nickel, iron, and copper was detected in some fish species collected in these areas. High concentrations of arsenic positively correlated with some of the histopathologies found, such as hepatic steatosis and interlamellar hyperplasia in the gills. The results of this study provide a basis for assessing the new conditions that species are facing, being relevant for future monitoring studies, highlighting the importance of ongoing research in this area for a better understanding and management of affected ecosystems.

Keywords: Heavy Metals. Oxidative Stress. Tailing Dam. Histopathology.

## Sumário

Sumário.....	7
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2. OBJETIVOS .....	13
2.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	13
2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	13
3. REFERÊNCIAS.....	13
1. INTRODUÇÃO .....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
2.1. <i>Área de estudo</i> .....	22
2.2. <i>Coleta</i> .....	23
2.3. <i>Análise das concentrações de metais</i> .....	24
2.4. <i>Avaliação do estresse oxidativo</i> .....	24
2.4.1. <i>Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo</i> .....	25
2.4.1.1. <i>Análise de Óxido Nítrico</i> .....	25
2.4.1.2. <i>Determinação de Malondialdeído</i> .....	25
2.4.1.3. <i>Avaliação da oxidação de proteínas (Proteínas carboniladas)</i> .....	25
2.4.2. <i>Determinação da atividade de enzimas antioxidantes</i> .....	26
2.4.2.1. <i>Atividade de superóxido dismutase (SOD)</i> .....	26
2.4.2.2. <i>Atividade da catalase (CAT)</i> .....	26
2.4.2.3. <i>Atividade da glutathione-S-transferase (GST)</i> .....	26
2.4.3. <i>Análise de proteína total</i> .....	26
2.5. <i>Análise histopatológica</i> .....	26
2.6. <i>Análise estatística</i> .....	28
3. RESULTADOS .....	28
3.1. <i>Concentração muscular de metais</i> .....	28
3.2. <i>Avaliação do estresse oxidativo</i> .....	33
3.2.1. <i>Fígado</i> .....	33
3.2.2. <i>Brânquias</i> .....	36
3.3. <i>Avaliações histopatológicas</i> .....	39
3.3.1. <i>Fígado</i> .....	39
3.3.1.1. <i>Principais alterações morfofisiológicas</i> .....	39
3.3.1.2. <i>Fibrose hepática</i> .....	43

3.3.1.3. Glicogênio hepático .....	44
3.3.2. <i>Brânquias</i> .....	44
3.3.3. <i>Correlação entre as concentrações de metais e as histologias no fígado e nas brânquias</i> .....	48
4. DISCUSSÃO .....	48
5. CONCLUSÃO.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

A atividade de extração mineral exerce uma função de destaque na economia brasileira, desempenhando papel fundamental na aquisição de diversos recursos minerais, tais como ferro, ouro, lítio, nióbio, entre outros (“Secretaria Nacional de Geologia, Mineração e Transformação Mineral – SNGM”, 2021). A prática da extração mineral ocorre em distintas áreas do território nacional, sendo notável a predominância na região Sudeste, que abriga a maior parte das reservas minerais (DE CARVALHO et al., 2014).

A mineração no Brasil é normatizada pelo Código de Mineração, o qual define as diretrizes para a concessão de autorizações de exploração mineral. Dessa forma, empresas que pretendem explorar uma área específica devem obter uma licença ambiental, emitida pelo órgão ambiental competente, por meio da realização de avaliações de impacto ambiental (MARTINS, 2017).

Entretanto, a atividade mineradora também pode acarretar consequências adversas para o ecossistema e o bem-estar humano, tais como a poluição do solo, da água e do ar devido à presença de metais pesados e outros compostos químicos empregados durante a etapa de extração (FARIA et al., 2023). Nesse sentido, com o propósito de restringir os resíduos provenientes das atividades extrativistas, são erguidas barragens de rejeitos, com o intuito de prevenir o contato desses detritos com outros segmentos dos cursos d’água (SOBREIRA, 2021). A contaminação decorrente dos resíduos, especialmente metais pesados, tem o potencial de afetar tanto a fauna quanto a flora dos ecossistemas aquáticos e terrestres, comprometendo a ciclagem de nutrientes e a biodiversidade da região (BRIFFA; SINAGRA; BLUNDELL, 2020; TCHOUNWOU et al., 2012).

O colapso de barragens de rejeitos de mineração configura-se como uma das principais ameaças de impacto ambiental associadas à prática de mineração (WU et al., 2022). Um notável exemplo é a ruptura da barragem de Fundão, localizada em Mariana, Minas Gerais, em 2015, que representou um dos maiores desastres ambientais já ocorridos no Brasil (ASCOM/IBAMA, 2016). A estrutura, destinada ao armazenamento de rejeitos de mineração, colapsou, liberando aproximadamente 50 milhões de metros cúbicos de lama e resíduos tóxicos na bacia do Rio Doce (NASCIMENTO et al., 2022). Esse incidente gerou impactos substanciais nos ecossistemas aquáticos (SCHETTINI; HATJE, 2020) e terrestres (COELHO et al., 2020), resultando também em danos às comunidades locais (DELL’ARINGA et al., 2022).

Uma das principais complicações decorrentes do rompimento na barragem de Fundão foi o fato de que a lama tóxica liberada continha uma elevada concentração de metais pesados, como ferro, manganês, chumbo, cromo, arsênio e mercúrio, os quais foram dispersos na bacia do Rio Doce (DAVILA et al., 2020). Estes elementos de peso molecular elevado são altamente tóxicos, sendo capazes de induzir uma série de efeitos adversos tanto na saúde humana quanto na fauna (Fu & Xi, 2019; TCHOUNWOU et al., 2012). Tais elementos têm a capacidade de se bioacumular nos tecidos de organismos vivos, provocando danos significativos nos sistemas nervoso, cardiovascular, hepático e renal, bem como em outros órgãos. Adicionalmente, a exposição a esses metais pesados pode resultar em distúrbios no desenvolvimento infantil e aumentar a suscetibilidade ao câncer em indivíduos adultos (REHMAN et al., 2017).

A solubilidade inerente a esses metais facilita sua assimilação pelas espécies aquáticas, conferindo à água um papel fundamental como canal primordial de interação entre os contaminantes e os organismos aquáticos (KAHLON et al., 2018). A natureza persistente desses elementos impede sua degradação espontânea, atribuindo-lhes uma notável propensão à bioacumulação nos tecidos e órgãos de organismos aquáticos. Tal fenômeno conduz a alterações significativas nos aspectos bioquímicos e alterações histopatológicas nessas espécies, desencadeando impactos adversos na saúde e na integridade fisiológica dos organismos (SHAHJAHAN et al., 2022).

Nesse cenário, os peixes emergem como modelos propícios para investigações toxicológicas em determinados cursos d'água, dada a tendência de bioacumulação de metais em seus tecidos. A seleção desses organismos como indicadores revela-se estratégica para a avaliação da presença e do potencial impacto desses elementos no ecossistema aquático, proporcionando uma compreensão abrangente dos efeitos adversos associados à contaminação por metais (PRAGNYA et al., 2021).

Os metais pesados são caracterizados por sua configuração eletrônica instável e por isto apresentam-se como grandes aceptores de elétrons. Esta instabilidade na nuvem eletrônica aumenta a capacidade destes compostos de receberem e doarem elétrons, por isso são considerados elementos propensos a assumirem o papel de radicais livres (RL) (ENGWA et al., 2019). Este atributo lhes confere a capacidade de participar em reações redox, induzindo, assim, um contexto propício para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A elevada produção dessas espécies compromete a homeostase celular, especialmente por promover danos lipídicos, alterações no DNA e modificações proteicas (JOMOVÁ et al., 2023). O desdobramento desses eventos contribui para o estabelecimento de um estado celular e tecidual conhecido como estresse oxidativo, fenômeno intrinsecamente associado a um desequilíbrio entre os processos de formação e degradação de RL e EROs dentro das células. No âmbito celular, este desequilíbrio provoca uma cascata de eventos danosos, comprometendo a integridade estrutural e funcional das células (KOPOTKOB, 2023). Em nível tecidual, o estresse oxidativo pode culminar em alterações prejudiciais, potencialmente desencadeando disfunções em órgãos vitais (HAJAM et al., 2022).

O arsênio é um elemento químico presente em abundância na natureza. Embora seja categorizado formalmente como um metaloide, devido às suas propriedades que exibem características tanto de metais quanto de não-metais, é amplamente reconhecido como um metal pesado na área da toxicologia. Essa classificação se deve principalmente à sua notória capacidade de bioacumulação em organismos vivos, conforme apontado por JOMOVA et al. em 2011. Os estados de oxidação predominantes do arsênio incluem +5, +3 e -3, nos quais o elemento demonstra a capacidade de criar compostos tanto inorgânicos quanto orgânicos. Quando associado a outros elementos como oxigênio, enxofre e cloro, é denominado arsênio inorgânico, enquanto em combinação com hidrogênio e carbono, é referido como arsênio orgânico (ORLOFF et al., 2009). Algumas pesquisas corroboraram a produção de radicais livres durante o metabolismo do arsênio, tanto na forma de oxigênio reativo quanto de nitrogênio reativo, desencadeando processos de morte e danos celulares ao ativar vias de sinalização sensíveis à oxidação (Roy et al., 2009). O arsênio desempenha um papel na formação de várias espécies reativas, incluindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais peroxila de dimetilarsínico

( $[(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}^*]$ ) e o radical dimetilarsínico ( $[(\text{CH}_3)_2\text{As}^*]$ ) (YAMANAKA & OKADA, 1994). Apesar de o mecanismo exato de geração dessas espécies ainda não estar totalmente compreendido, sugere-se a formação de intermediários de arsina. Uma via para a produção de peróxido de hidrogênio foi explicada pela oxidação do arsenito para arsênio pentavalente, que, sob condições fisiológicas, resulta na formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma fonte potencialmente danosa de radicais hidroxila (MISHRA & FLORA, 2008). Além disso, o arsênio exerce seus efeitos tóxicos ao se ligar aos grupos sulfidrila das proteínas e ao gerar o esgotamento da glutatona. Dessa forma, esses estudos sugerem que a glutatona (GSH) provavelmente desempenha um papel como doador de elétrons na redução de arsenicais pentavalentes para trivalentes, e que o arsenito tem uma alta afinidade pela glutatona (JOMOVA et al. em 2011).

Dessa forma, para manter a integridade e o equilíbrio intracelular, as células desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, envolvendo tanto sistemas enzimáticos quanto não enzimáticos (DEMIRCI-ÇEKIÇ et al., 2022). Dentre os mecanismos enzimáticos, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a conversão do radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por sua vez, é neutralizado pela enzima catalase (CAT), a qual converte  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio. Adicionalmente, a glutatona peroxidase é uma enzima relevante que reduz peróxidos orgânicos, utilizando a glutatona reduzida (GSH) como cofator (ALI et al., 2020). Concomitantemente, os mecanismos não enzimáticos abrangem moléculas antioxidantes, como é o caso da glutatona, que desempenha o papel de um redutor, neutralizando os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs). Por meio da doação de um elétron para os radicais livres, a glutatona é convertida em sua forma oxidada, conhecida como glutatona dissulfeto (GSSG). Após essa doação, a glutatona oxidada (GSSG) é regenerada à sua forma reduzida (GSH) pela ação da enzima glutatona redutase. Essa regeneração constante da GSH é fundamental para manter um pool intracelular adequado de glutatona reduzida, essencial para o funcionamento de outras enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (AVERILL-BATES, 2023). Outros exemplos incluem o ácido ascórbico (vitamina C) e o alfa-tocoferol (vitamina E). Essas substâncias atuam como doadoras diretas de elétrons, neutralizando espécies reativas de oxigênio e protegendo as biomoléculas contra danos oxidativos (FERREIRA; MV ABREU, 2007).

Neste cenário, quando a produção excessiva de radicais livres e espécies reativas excede a capacidade dos antioxidantes de neutralizá-los, ocorre uma propensão à oxidação de biomoléculas. Esse processo resulta na formação de metabólitos específicos, conhecidos como marcadores do estresse oxidativo, que podem ser detectados e quantificados. Estes marcadores são principalmente produtos da oxidação de lipídios, proteínas e DNA, com os lipídios sendo os mais proeminentes (BARBOSA et al., 2010). O malondialdeído (MDA) é um importante marcador de oxidação lipídica, pois sua formação está estreitamente ligada ao processo de peroxidação lipídica. Quando ácidos graxos insaturados são atacados por radicais livres, um átomo de hidrogênio é removido, resultando na geração de um radical lipídico. Esse radical lipídico então reage com oxigênio molecular, formando peróxidos lipídicos que podem se decompor em aldeídos reativos, incluindo o MDA. Como subproduto deste processo, o MDA desempenha um papel essencial como indicador do nível de estresse oxidativo (GROTTO et al., 2008). Outro marcador amplamente utilizado é o de proteínas carboniladas. Essas proteínas podem sofrer danos tanto pela ação direta de EROs quanto por moléculas geradas durante processos de oxidação, como o MDA. Esses danos podem ocorrer em diferentes regiões da

estrutura primária das proteínas, resultando em diversos produtos finais. Os radicais hidroxila são particularmente prejudiciais, atacando as ligações peptídicas e gerando radicais alcóxila e peróxila. Essa geração de radicais pode levar à formação de peróxidos nas cadeias laterais ou centrais das proteínas, além de causar fragmentações e originar grupos carbonila (TREVISAN, 2008). Assim, a presença de grupos carbonila nas proteínas reflete a extensão do dano oxidativo e pode ser utilizada como um indicador confiável do estresse oxidativo no organismo. Um marcador adicional amplamente empregado é o óxido nítrico (NO). Embora desempenhe funções vitais no organismo, como a regulação do tônus vascular e funções imunológicas, além de atuar como mensageiro ou modulador em diversos processos biológicos essenciais, variações nos níveis de NO podem estar ligadas a processos oxidativos no corpo. O NO, na presença de oxigênio molecular ( $O_2$ ), gera quantidades significativas de espécies oxidantes, como o dióxido de nitrogênio ( $NO_2^*$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Além disso, o NO reage com o radical superóxido ( $O_2^{*-}$ ) ou com seu ácido ( $HO_2^*$ ) para formar os radicais  $NO_2^*$  e hidroxila ( $OH^*$ ). Portanto, o óxido nítrico também é utilizado como um indicador do estresse oxidativo (BOGACZ, 2016).

Uma alternativa para avaliar o estresse oxidativo é por meio de métodos indiretos, que se fundamentam na capacidade antioxidante do organismo. Nesse contexto, enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST) são frequentemente utilizadas como indicadores de estresse oxidativo devido às suas funções na proteção contra danos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (BARBOSA et al., 2010). A SOD, como já mencionado, desempenha um papel essencial na defesa contra o radical superóxido ( $O_2^{*-}$ ), convertendo-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto a CAT decompõe o  $H_2O_2$  em água e oxigênio, protegendo as células contra danos oxidativos. Por sua vez, a GST está envolvida na conjugação de xenobióticos eletrofílicos com glutatona (GSH), reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção, além de contribuir ativamente na metabolização de compostos endógenos e exógenos. Sendo assim, principalmente por sua sensibilidade a compostos exógenos, a GST têm sido largamente utilizada como biomarcador de estresse oxidativo. A atividade dessas enzimas não só indica a presença de espécies reativas de oxigênio, mas também reflete o estado antioxidante global do organismo (TREVISAN, 2008).

A análise do dano tecidual surge como um indicador fundamental para a elucidação da toxicidade vinculada à exposição a metais pesados (PADRILAH et al., 2018). No contexto da investigação toxicológica, a análise histopatológica desempenha uma função central, permitindo uma minuciosa investigação das alterações morfológicas e estruturais nos tecidos submetidos à exposição do agente agressor (ABDEL-MONEIM et al., 2012). Através do estudo histopatológico, torna-se possível discernir padrões específicos de lesões celulares, identificar a presença de alterações inflamatórias, degenerativas, vasculares e outras respostas teciduais, contribuindo para uma compreensão dos efeitos adversos provocados pelos metais (RODRIGUES et al., 2019).

A análise histopatológica dos tecidos hepáticos e branquiais em peixes se configura como uma ferramenta imprescindível para a investigação toxicológica de uma determinada região (KASPER, 2019). No presente contexto, ressalta-se o fígado como órgão de primordial relevância, caracterizando-se como o principal sítio de metabolização de substâncias tóxicas no organismo. Sua preponderância nesse processo faz com que seja um dos primeiros órgãos a sofrer danos em decorrência da exposição a metais pesados (JAVED & USMANI, 2019). Os desdobramentos resultantes dessa exposição induzem a manifestação de processos degenerativos de

natureza reversível, cuja progressão pode culminar em eventos de morte celular e fibrose, que caracterizam as alterações irreversíveis (WEBER et al., 2020). Paralelamente, a agressão ao tecido hepático frequentemente acarreta alterações vasculares expressivas, como congestão, marginação leucocitária e hiperemia. Essas modificações comprometem substancialmente a microcirculação hepática, impactando negativamente a nutrição e o metabolismo do tecido (ONISHI, 2022).

Para além do fígado, as brânquias também se destacam como órgão de notável suscetibilidade aos poluentes (ZHANG et al., 2019). Situadas em proximidade imediata ao meio externo, essas estruturas têm relevância vital na regulação da troca gasosa e homeostase iônica em peixes. A vascularização intensa das brânquias, embora essencial para as funções fisiológicas, também as expõe aos contaminantes presentes na água (DOS SANTOS et al., 2021). Degeneração do epitélio, hiperplasia, inflamação e fibrose são sinais observáveis que indicam reações desfavoráveis à exposição a poluentes (FONSECA et al., 2017).

Diante desse contexto, a necessidade de estudos aprofundados se evidencia, demandando uma análise específica dos impactos decorrentes do colapso da barragem em Mariana, MG, sobre a ictiofauna, bem como uma investigação acerca da contaminação crônica por poluentes tóxicos na Bacia do rio Doce.

## **2. OBJETIVOS**

### *2.1. Objetivo Geral*

Investigar os impactos do rompimento da barragem de Fundão na saúde da ictiofauna silvestre, através da comparação entre peixes coletados em áreas afetadas pelos rejeitos e áreas não afetadas. Pretende-se contribuir significativamente para o entendimento dos efeitos desse desastre ambiental, fornecendo uma base sólida para a predição do atual estado de saúde de cinco espécies presentes nesse ecossistema aquático. As informações obtidas serão de extrema relevância para a gestão e conservação desses ambientes, permitindo a implementação de medidas eficazes de mitigação e recuperação.

### *2.2. Objetivos Específicos*

- Avaliar as concentrações de metais em amostras de tecidos;
- Avaliar os principais marcadores de estresse oxidativo em brânquias e fígado de peixes coletados em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem;
- Avaliar as principais alterações histopatológicas em brânquias e fígado e a correlação destas com as concentrações de metais em peixes coletados em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem;

## **3. REFERÊNCIAS**

ABDEL-MONEIM, A. M. et al. Gill Oxidative Stress and Histopathological Biomarkers of Pollution Impacts in Nile Tilapia from Lake Mariut and Lake

- Edku, Egypt. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 24, n. 3, p. 148–160, 16 ago. 2012.
- ALI SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem*. 2020 Mar;44(3):e13145. doi: 10.1111/jfbc.13145. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31960481.
- ASCOM/IBAMA. Rompimento da Barragem de Fundão: Documentos relacionados ao desastre da Samarco em Mariana/MG. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/informes/rompimento-da-barragem-de-fundao>>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- AVERILL-BATES DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*. 2023;121:109-141. doi: 10.1016/bs.vh.2022.09.002. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36707132.
- BARBOSA, K. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista De Nutricao-brazilian Journal of Nutrition*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 1 ago. 2010.
- BOGACZ, Alvaro Cesar. Óxido nítrico como monitor do estresse oxidativo, em retalho cutâneo randômico isquêmico, no rato. 2002 93 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2002.
- BRIFFA, J.; SINAGRA, E.; BLUNDELL, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, v. 6, n. 9, p. e04691–e04691, 1 set. 2020.
- COELHO, D.G., Marinato, C.S., de Matos, L.P., de Andrade, H.M., da Silva, V.M., Neves, P.H.S. and de Oliveira, J.A. (2020), Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundão Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integr Environ Assess Manag*, 16: 596-607. <https://doi.org/10.1002/ieam.4253>
- DAVILA RB, Fontes MPF, Pacheco AA, Ferreira MDS. Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. *Sci Total Environ*. 2020 Mar 20;709:136151. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136151. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31887517.

DE CARVALHO, R. et al. Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação O peso da mineração na Região Sudeste CCL0014-00-14 -Capítulo do livro “Recursos Minerais e Sociedade: impactos humanos -socioambientais -econômicos”. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/1849/1/CCL0014-00-14%20Alamino\\_Villa%20Verde\\_Fernandes%20%282014%29.pdf](http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/1849/1/CCL0014-00-14%20Alamino_Villa%20Verde_Fernandes%20%282014%29.pdf)>. Acesso em: 9 jan. 2024.

DELL'ARINGA, M. F. et al. Mental Health Services Utilization by the Population That Suffered Water Supply Interruption Following Mariana Dam Failure (Brazil). *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, v. 17, 29 jun. 2022.

DEMIRCI-ÇEKIÇ S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoglu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal.* 2022 Feb 5;209:114477. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114477. Epub 2021 Nov 28. PMID: 34920302.

DOS SANTOS Almeida S, Silva Oliveira V, Ribeiro Dantas M, Luiz Borges L, Teixeira de Sabóia-Morais SM, Lopes Rocha T, Luiz Cardoso Bailão EF. Environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induce differential histopathological responses in gills and liver of freshwater fish. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Sep;28(33):44890-44901. doi: 10.1007/s11356-021-13839-0. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33852111.

ENGWA, Godwill & Okeke, Paschaline & Nwalo, Nweke, & Unachukwu, Marian. (2019). Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. 10.5772/intechopen.82511.

FARIA, M. et al. INTOXICAÇÃO POR METAIS PESADOS NA MINERAÇÃO E SEU IMPACTO NA SAÚDE HUMANA. *Foco*, v. 16, n. 6, p. e2319–e2319, 15 jun. 2023.

FERREIRA, ICFR; Abreu, Rui M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*. ISSN 1646-1266. IV:2. p. 32-39

FONSECA, A. et al. The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: A statistical perspective. *Science of*

- The Total Environment, v. 599-600, p. 217–226, 1 dez. 2017.
- FU, Z.; SHI, X. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 30, n. 3, p. 167–176, 17 dez. 2019.
- GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 275–279, 1 jan. 2008.
- HAJAM YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, Pramodh S, Alsulimani A, Alkhanani MF, Harakeh S, Hussain A, Haque S, Reshi MS. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*. 2022 Feb 5;11(3):552. doi: 10.3390/cells11030552. PMID: 35159361; PMCID: PMC8833991.
- JAVED, M., Usmani, N. An Overview of the Adverse Effects of Heavy Metal Contamination on Fish Health. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 89, 389–403 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0875-7>
- JOMOVA, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of applied toxicology: JAT*, 31(2), 95–107. <https://doi.org/10.1002/jat.1649>
- JOMOVA K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023 Oct;97(10):2499-2574. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9. Epub 2023 Aug 19. PMID: 37597078; PMCID: PMC10475008.
- KAHLON, S.K., Sharma, G., Julka, J.M. *et al.* Impact of heavy metals and nanoparticles on aquatic biota. *Environ Chem Lett* 16, 919–946 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0737-4>
- KASPER, N. Respostas histopatológicas e genotóxicas em peixes de água doce expostos a ambientes antropizados. *Uffs.edu.br*, 22 fev. 2019.
- KOPOTKOB, C. M. Mitochondrial Oxidative Stress Is the General Reason for Apoptosis Induced by Different-Valence Heavy Metals in Cells and

Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 19, p. 14459–14459, 22 set. 2023.

MARTINS, Carla Ferreira Vieira. Avaliação das normas reguladoras de mineração para minas subterrâneas no Brasil e da Legislação Mineral Brasileira para segurança em subsolo. 2017. 182 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

MISHRA, D., FLORA, S.J.S., 2008. Differential oxidative stress and DNA damage in ratbrain regions and blood following chronic arsenic exposure. *Toxicol. Ind. Health*24, 247–256.

ONISHI, K. Avaliação da hepatotoxicidade dos poluentes do Rio Doce através das análises histopatológicas no fígado dos peixes. 2021. (Bacharel). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Vicente.

ORLOFF, K., Mistry, K., & Metcalf, S. (2009). Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 12(7), 509–524.  
<https://doi.org/10.1080/10937400903358934>

PADRILAH, S. et al. TROPICAL AGRICULTURAL SCIENCE Toxicity Effects of Fish Histopathology on Copper Accumulation. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci*, v. 41, n. 2, p. 519–540, 2018

PRAGNYA M, Ajay B, Kumar SD, Byragi Reddy T. Bioaccumulation of heavy metals in different trophic levels of aquatic ecosystems with fish as a bioindicator in Visakhapatnam, India. *Mar Pollut Bull.* 2021 Apr;165:112162. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112162. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33610109.

REHMAN, K. et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 119, n. 1, p. 157–184, 2 ago. 2017.

RODOLFO LEANDRO NASCIMENTO et al. The Fundão dam failure: Iron ore tailing impact on marine benthic macrofauna. *Science of The Total Environment*, v. 838, p. 156205–156205, 1 set. 2022.

- RODRIGUES, S. et al. Histopathological effects of the antibiotic erythromycin on the freshwater fish species *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 181, p. 1–10, 1 out. 2019.
- ROY, A., Manna, P., Sil, P.C., 2009. Prophylactic role of taurine on arsenic mediated oxidative renal dysfunction via MAPKs/NF-B and mitochondria dependent pathways. *Free Radic. Res.* 43, 995–1007.
- SCHETTINI CA, Hatje V. The Suspended Sediment and Metals Load from the Mariana's Tailing Dam Failure to the Coastal Sea. *Integr Environ Assess Manag.* 2020 Sep;16(5):661-668. doi: 10.1002/ieam.4274. Epub 2020 May 28. PMID: 32220000.
- Secretaria Nacional de Geologia, Mineração e Transformação Mineral – SNGM. Disponível em: <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/geologia-mineracao-e-transformacao-mineral>>. Acesso em: 9 jan. 2024.
- SHAHJAHAN M, Taslima K, Rahman MS, Al-Emran M, Alam SI, Faggio C. Effects of heavy metals on fish physiology - A review. *Chemosphere.* 2022 Aug;300:134519. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134519. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35398071.
- SOBREIRA, A. P. Estudos sobre as barragens de rejeitos do estado de Goiás. *Epitaya E-books* 1(11):152-169, 2021. <https://doi.org/10.47879/ed.ep.2021366p152>.
- TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *EXS*, p. 133–164, 1 jan. 2012.
- WEBER AA, Sales CF, de Souza Faria F, Melo RMC, Bazzoli N, Rizzo E. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020 Mar 1;190:110165. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110165. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31918258.
- TREVISAN, R. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. *Ufsc.br*, 2008.

WU, M. et al. Scientometric analysis on the review research evolution of tailings dam failure disasters. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, n. 6, p. 13945–13959, 23 dez. 2022.

YAMANAKA, K., OKADA, S., 1994. Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ. Health Perspect.* 102, 37–40.

ZHANG, Y. et al. Chronic exposure to dichloroacetamide induces biochemical and histopathological changes in the gills of zebrafish. *Environmental Toxicology*, v. 34, n. 7, p. 781–787, 18 mar. 2019.

## 1. INTRODUÇÃO

O colapso da barragem de Fundão, em novembro de 2015, no município de Mariana, estado de Minas Gerais, destacou-se como um dos mais significativos desastres ambientais já registrados no país (CORDEIRO et al., 2019). Este evento ganhou notoriedade devido à liberação de aproximadamente 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério no curso do Rio Doce, assemelhando-se a outros desastres ambientais ao redor do mundo, como o desastre de Aznalcollar na Espanha (1998), que rompeu liberando mais de cinco milhões de metros cúbicos de rejeito contendo água com ácidos e altos níveis de zinco e cádmio, e o rompimento da barragem de Mount Polley no Canadá (2014), que liberou mais de 24 milhões de metros cúbicos de água e rejeitos (REIS et al., 2020). Esses eventos resultaram em danos irreparáveis aos ecossistemas locais, incluindo a destruição de comunidades e impactos severos sobre a fauna e flora da região (SÁNCHEZ et al., 2018; BOTELHO et al., 2021; REIS et al., 2020).

A disseminação do fluxo de rejeitos, decorrente do rompimento da barragem, apresentou uma composição diversificada, incorporando não apenas os metais característicos do minério, como ferro (Fe) e manganês (Mn), mas também elementos de caráter tóxico e metaloides, a exemplo do cromo (Cr), chumbo (Pb), arsênio (As) e mercúrio (Hg), revolvidos do sedimento pela enxurrada de rejeitos (VIEIRA et al., 2022; FERREIRA et al., 2020; BALLOTIN et al., 2023). A análise de amostras de água e sedimento do Rio Doce evidenciou modificações significativas nas concentrações de metais pesados nas áreas impactadas pelos rejeitos (VERGÍLIO et al., 2021). Esse fenômeno, impulsionado pela ressuspensão de elementos tóxicos, promoveu alterações na turbidez e qualidade da água, exercendo um impacto direto e prejudicial à sobrevivência da ictiofauna (SILVA et al., 2016; BOTTINO et al., 2017).

A presença desses metais na água facilita sua disseminação e exposição aos tecidos, resultando em modificações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas nos organismos expostos (ONKAR and SULOCHANA, 2015). Comumente, os peixes absorvem esses metais através das brânquias, pele ou ingestão, sendo posteriormente assimilados no fígado, onde geralmente são metabolizados (AGBUGUI & ABE, 2022). De maneira geral, é observado que o fígado e as brânquias são órgãos particularmente suscetíveis a manifestarem alterações morfofisiológicas em resposta à exposição a agentes tóxicos (ARDESHIR et al., 2017; CAMARGO et al., 2009; YACOUBet al., 2021). Esta propensão se deve, em grande medida, da função proeminente desempenhada pelo fígado na metabolização de substâncias tóxicas, onde desencadeia processos bioquímicos complexos visando a detoxificação do organismo (ABALAKA et al., 2020). Dessa forma, a proeminente sensibilidade hepática é reflexo da prontidão deste órgão em mobilizar recursos biológicos a fim de neutralizar os efeitos nocivos de compostos exógenos tóxicos (SHMARAKOV et al., 2017). Além disso, as brânquias demonstram-se suscetíveis, sobretudo devido a uma característica vital no que tange às trocas gasosas (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>): o contato direto com o ambiente aquático. Esta exposição direta torna-as particularmente sensíveis à presença de substâncias tóxicas, aumentando sua propensão a sofrer alterações adversas em resposta à presença desses contaminantes (GOMES et al., 2012; LIEBEL et al., 2013; DORIA et al., 2017; ALE et al., 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres (RL), que surgem como subprodutos do metabolismo normal do corpo, desempenham papel crucial nas alterações teciduais quando seu equilíbrio é perturbado (Fu & Xi, 2019). O aumento

na produção de radicais livres e EROs dentro das células cria um desequilíbrio oxidativo, resultando em um estado de estresse oxidativo celular. Este estado é caracterizado pela incapacidade do sistema antioxidante em neutralizar eficientemente a produção excessiva de EROs, levando a alterações bioquímicas e estruturais nos tecidos (TESCHKE, 2022).

A presença de metais pesados tem sido identificada como um agente potencial de intensificação da geração exacerbada de EROs, comprometendo assim a homeostase celular (RENU et al., 2021; BALALI-MOOD et al., 2021). Estudos indicam que metais redox ativos, como ferro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr), cobalto (Co) e outros, participam de reações de ciclo redox, manifestando a capacidade de gerar radicais reativos, como o radical ânion superóxido e o óxido nítrico, em sistemas biológicos. Em contrapartida, metais redox inativos, a exemplo de cádmio (Cd), arsênio (As) e chumbo (Pb), revelam seus efeitos tóxicos ao se ligarem a grupos sulfidríla de proteínas e esgotarem os níveis de glutathione (JOMOVA et al., 2011). No entanto, o arsênio parece adotar um mecanismo de ação alternativo, baseado na produção de peróxido de hidrogênio e outros radicais reativos, incluindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), radicais peroxila de dimetilarsínico ( $[(CH_3)_2AsOO^{\cdot}]$ ) e o radical dimetilarsínico ( $[(CH_3)_2As^{\cdot}]$ ) em condições fisiológicas (YAMANAKA & OKADA, 1994). Esse desequilíbrio na formação de radicais reativos pode desencadear processos de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e danos ao DNA (RAHMAN et al., 2019; SANJEEV et al., 2019). Tais eventos podem resultar em disfunções celulares, como degenerações ou alterações a nível nuclear, culminando em processos de apoptose ou necrose (ZULKIPLI et al., 2021).

A importância das defesas antioxidantes, que incluem tanto mecanismos enzimáticos quanto não enzimáticos, é fundamentalmente destacada neste contexto. Essas defesas são essenciais para neutralizar os efeitos danosos do estresse oxidativo, garantindo assim a preservação da integridade dos tecidos. Ao acelerar a passagem de elétrons para espécies eletronicamente instáveis, as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxiredoxina, desempenham um papel ativo na neutralização de radicais livres e peróxidos, tornando os compostos mais estáveis e evitando danos oxidativos. Além disso, os antioxidantes não enzimáticos, como vitaminas C e E, e compostos como glutathione e carotenoides, também contribuem significativamente para a defesa antioxidante, neutralizando os radicais livres, atuando como doadores diretos de elétrons, protegendo assim as células contra danos oxidativos. (EL-BOSHY et al., 2015; FORMAN & ZHANG, 2021).

Por essas razões, a exploração dos biomarcadores de estresse oxidativo é essencial para compreender o impacto dos metais pesados em ecossistemas aquáticos (VALAVANIDIS et al., 2006; KROON et al., 2017), particularmente em cenários pós-ruptura de barragens (VIEIRA et al., 2022). Dessa forma, o escopo central deste estudo é realizar uma avaliação abrangente do estado de saúde de cinco espécies de peixe na Bacia do Rio Doce, Brasil. Isso será alcançado por meio da análise das concentrações musculares de 12 metais, em conjunto com a identificação de alterações oxidativas e histopatológicas. O objetivo é estabelecer comparações significativas entre animais coletados em áreas afetadas pelo colapso da barragem do Fundão e aqueles provenientes de áreas não afetadas. Essa abordagem multifacetada visa proporcionar uma compreensão mais abrangente do estado de saúde dos animais nos pontos amostrados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

Para a condução do presente estudo, foi deliberada a seleção de 14 pontos estratégicos situados na bacia hidrográfica do Rio Doce. Dentre esses, sete pontos foram especificamente identificados como áreas afetadas pela passagem da onda de rejeitos resultante do rompimento da barragem de Fundão, abrangendo a calha principal do Rio Doce e o curso d'água do rio do Carmo. Além disso, outros sete pontos foram designados como áreas não afetadas, escolhidos entre os principais afluentes do Rio Doce. Todos esses pontos estão detalhadamente descritos nas representações gráficas apresentadas na Figura 1 e Tabela 1.

Figura 1. Mapa dos pontos de coleta. ★ Local do rompimento da barragem; em vermelho – áreas afetadas diretamente pelos rejeitos; em verde – área não afetada pelos rejeitos.

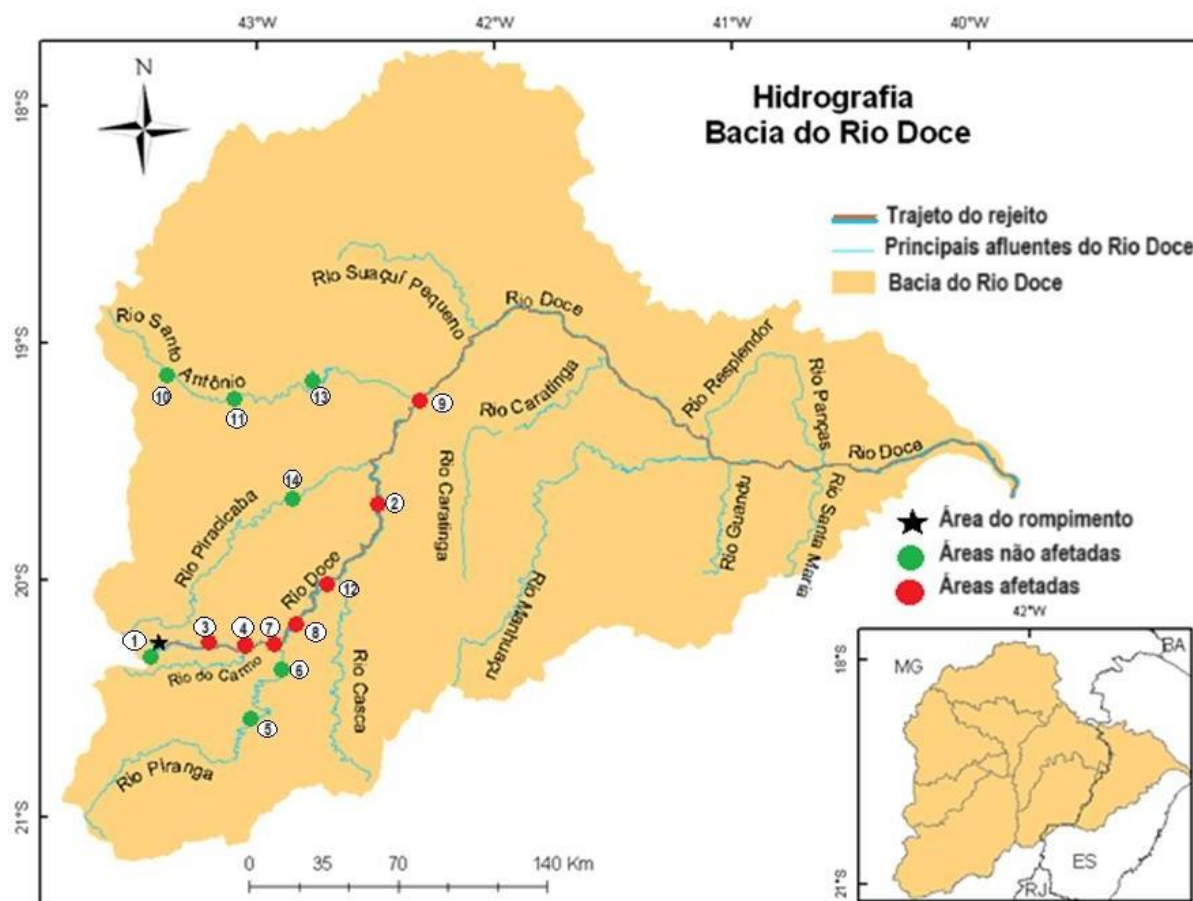


Tabela 1: Pontos de coleta das espécies utilizadas no estudo.

Local	Coordenadas geográficas (UTM)	Rio	Atributo
Ponto 1	23K 0663787 7757153	(Mariana - Gualaxo do Sul)	Área não afetada
Ponto2	23K 0764251 7814314	(Ponte Queimada, PERD - Rio Doce)	Área afetada

Ponto 3	23K 0688284 7754717	(Paracatu de Baixo – Mariana- Rio do Carmo)	Área afetada
Ponto 4	23K 0704609 7756231	(Barra Longa - Rio do Carmo)	Área afetada
Ponto 5	23K 0709489 7727114	(Guaraciaba - Rio Piranga)	Área não afetada
Ponto 6	23K 0719459 7750642	(Montante casa de Juliano - Rio Piranga)	Área não afetada
Ponto 7	23K 0717886 7756690	(Quintal do Juliano - Rio Doce)	Área afetada
Ponto 8	23K 0724451 7765328	(Jusante de UHE Candonga – Rio Doce)	Área afetada
Ponto 9	23K 0782354 7869156	(Naque - Rio Doce)	Área afetada
Ponto 10	23K 0687610 7872631	(Santo Antônio do Rio Abaixo – Rio Santo Antônio)	Área não afetada
Ponto 11	23K 0716429 7870370	(Ferros - Rio Santo Antônio)	Área não afetada
Ponto 12	23k 0735965 7785306	(São José do Goiabal-Rio Doce)	Área afetada
Ponto 13	23K 0738866 7879318	(Santo Antônio da Fortaleza - Rio Santo Antônio)	Área não afetada
Ponto 14	23K 0732869 7829391	(Jaguaraçu -Rio Piracicaba)	Área não afetada

## 2.2. Coleta

A coleta de amostras de animais foi conduzida durante a estação chuvosa, no período compreendido entre fevereiro e março de 2020. Para a captura de peixes, foram empregadas redes de emalhar de 10 metros de extensão, as quais apresentavam malhas de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 e 80 mm (distância entre nós). Em cada ponto de coleta, foram utilizados dois conjuntos de redes, totalizando 20 redes e cobrindo uma extensão de 200 metros. A instalação das redes ocorreu no período vespertino, sendo posteriormente retiradas na manhã seguinte, totalizando 12 horas de exposição na coluna d'água. Tal estratégia visou a abrangência de dois picos de atividade dos peixes, registrados no final da tarde e início da manhã.

Os espécimes coletados foram submetidos à anestesia seguida de eutanásia em solução contendo 4% de eugenol, composto ativo presente no óleo de cravo. Cada peixe capturado foi submetido a procedimentos de identificação, pesagem (em grama), medição (em milímetros) e registro fotográfico. Amostras de tecido foram cuidadosamente coletadas e armazenadas para análises subsequentes de metais (em músculo), estresse oxidativo (em fígado e brânquias) e análises histopatológicas (em fígado e brânquias), conforme detalhado nas seções subsequentes. Os espécimes foram então acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados, sendo separados conforme o ponto de coleta correspondente.

Posteriormente, os exemplares foram fixados em formalina 10% e transferidos para solução de álcool 70%. Este procedimento visou à obtenção de uma identificação taxonômica definitiva, culminando com o armazenamento na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen, da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Importante ressaltar que todas as atividades relacionadas à captura dos peixes, coleta

de amostras e manipulação dos animais foram conduzidas em conformidade com as normativas estabelecidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (nº 71706-2) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA UFV (nº 798/2018).

As espécies escolhidas para o estudo foram *Oligosarcus acutirostris* (Lambari-bocarra), *Loricariichthys castaneus* (Cascudo-viola), *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã), *Hypostomus affinis* (Cascudo-manteiga) e *Hoplias intermedius* (Trairão), assim como disposto na Tabela 2.

Tabela 2: Números de indivíduos (N) registrados de espécies nos tributários referência, não afetados (NA) e afetados (A).

<b>Espécie</b>	<b>Nome comum</b>	<b>NA</b>	<b>A</b>	<b>Total</b>
<i>Hoplias intermedius</i>	Trairão	37	89	126
<i>Hypostomus affinis</i>	Cascudo-manteiga	62	41	103
<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	11	25	36
<i>Loricariichthys castaneus</i>	Cascudo-viola	89	55	144
<i>Oligosarcus acutirostris</i>	Lambari-bocarra	23	38	61
<b>Total</b>		222	248	470

### 2.3. Análise das concentrações de metais

Amostras de tecido muscular foram coletadas *in situ* e imediatamente refrigeradas, posteriormente armazenadas a -20 °C, sendo encaminhadas para o laboratório Tommase Analítica LTDA, localizado em Vitória, ES, Brasil, para a quantificação das concentrações de metais pesados e arsênio. Os elementos analisados compreendem prata (Ag), alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), Cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn).

### 2.4. Avaliação do estresse oxidativo

As amostras hepáticas e branquiais das espécies coletadas foram extraídas em fragmentos de aproximadamente 200 mg, destinadas às avaliações do estresse oxidativo. Os fragmentos teciduais foram devidamente identificados e imediatamente preservados em nitrogênio líquido, sendo posteriormente alocados em um ultrafreezer a -80 °C, aguardando a aplicação em análises subsequentes das enzimas e marcadores de estresse oxidativo tecidual.

Os fragmentos foram segregados de acordo com as espécies, subsequentemente homogeneizados e centrifugados. O sobrenadante resultante dessas etapas foi empregado para determinação de parâmetros como óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e proteína total (PT). O pellet resultante foi destinado à quantificação de proteínas carboniladas (PC). Todas as análises enzimáticas foram realizadas em duplicatas, com a utilização de espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japan) ou leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.4.1. Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo

#### 2.4.1.1. Análise de Óxido Nítrico

A quantificação de óxido nítrico gerado pelos espécimes foi realizada por meio da reação padrão de Griess. Nesse procedimento, 50µL do sobrenadante previamente mencionado foram incubados com volume equivalente de reagente de Griess (composto por 1% de sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil)etilenodiamina e 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à temperatura ambiente, por um período de 10 minutos, conforme descrito por TSIKAS (2007). A absorvância resultante foi medida a 540nm utilizando um espectrofotômetro de varredura de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). A conversão da absorvância para concentrações micromolares de óxido nítrico foi realizada com base em uma curva padrão de nitrito de sódio (0-100µM) e expressa como concentrações de óxido nítrico (µmol/L).

#### 2.4.1.2. Determinação de Malondialdeído

A peroxidação lipídica foi quantificada conforme método descrito por BUEGE & AUST (1975), o qual avalia a formação total de malondialdeído (MDA) como indicador da peroxidação lipídica. Para a execução desse procedimento, foram utilizados 0,2mL do sobrenadante dos tecidos, os quais foram homogeneizados em 0,4mL de uma solução contendo ácido tricloroacético (TCA, 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,375%) e ácido clorídrico (HCl, 0,6%), seguido por vortexação. A mistura foi submetida a um banho-maria a 90°C por 40 minutos. Após o resfriamento em gelo, 0,6mL de álcool butanol foram adicionados, seguido por vortexação por 2 minutos e centrifugação a 9000g por 10 minutos. A absorvância foi lida a 535nm em um espectrofotômetro de varredura de microplacas. A concentração de MDA foi determinada mediante uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de 1,1,3,-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em µmol por mg de proteína.

#### 2.4.1.3. Avaliação da oxidação de proteínas (Proteínas carboniladas)

A oxidação proteica foi quantificada seguindo o protocolo descrito por LEVINE et al. (1990), utilizando os pellets obtidos após a homogeneização dos tecidos. O procedimento envolve a reação dos grupos carbonilas com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Os pellets foram ressuspensos em ácido tricloroacético (TCA) a 10%, mantidos em ambiente refrigerado, e submetidos à centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, adicionando-se 0,5mL de solução de DNPH a 10mmol/L diluída em ácido clorídrico (7%). A mistura foi vortexada e mantida à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos, com agitação periódica.

Posteriormente, 0,5mL de TCA gelado foi adicionado a cada tubo. O precipitado foi centrifugado novamente, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1mL de acetato de etila e etanol (1:1 v/v). Em seguida, 1mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 6% foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram, finalmente, centrifugados para dissolver os pellets, e a absorvância do sobrenadante foi medida a 370nm. Os resultados foram expressos em nmol/mL de proteína com base no coeficiente de extinção molar de  $\epsilon_{370} = 22\text{mmol/L} \times \text{cm}$ .

## 2.4.2. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

### 2.4.2.1. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos tecidos hepáticos e branquiais foi conduzida por meio de um leitor de microplacas ( $\lambda = 570\text{nm}$ ), seguindo o método proposto por DIETERICH et al. (2000). Este método fundamenta-se na capacidade da enzima em catalisar a reação entre o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), resultando na redução da taxa de auto-oxidação do pirogalol. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades de SOD por miligrama de proteína ( $\text{U SOD mg proteína}^{-1}$ ).

### 2.4.2.2. Atividade da catalase (CAT)

A avaliação da atividade da enzima catalase (CAT) foi realizada conforme o método proposto por AEBI et al. (1984). A atividade da enzima foi avaliada pela taxa de queda de absorvância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a uma concentração de 10mM, em tampão fosfato de potássio 0,2M (pH 7,0), utilizando um espectrofotômetro ( $\lambda = 240\text{nm}$ ). O coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio utilizado foi  $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em Unidades de Catalase por miligrama de proteína ( $\text{U CAT mg proteína}^{-1}$ ).

### 2.4.2.3. Atividade da glutationa-S-transferase (GST)

A avaliação da atividade enzimática da glutationa-S-transferase (GST) seguiu o método descrito por HABIG et al. (1974), fundamentado na formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno. A estimativa da atividade enzimática ocorreu em uma mistura composta por 1mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em etanol, 1mM de glutationa redutase (GSH) em fosfato de potássio (100mM, pH 7,0) e 10 $\mu\text{L}$  da amostra em análise. O aumento da absorvância ( $\lambda = 340\text{nm}$ ) foi monitorado ao longo de 60 segundos. O coeficiente de extinção molar do CDNB utilizado para os cálculos foi  $\epsilon_{340} = 9,6\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em micromoles por minuto por grama de tecido ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ).

## 2.4.3. Análise de proteína total

A quantificação da concentração de proteína total nos tecidos foi conduzida conforme a metodologia descrita por LOWRY et al. (1951), empregando albumina de soro bovino como curva padrão. Essa abordagem foi adotada com o propósito de estabelecer uma padronização nos resultados das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST), assim como nos marcadores de estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas (PC).

## 2.5. Análise histopatológica

Para a realização das análises histopatológicas, foi selecionado um grupo composto por 6 indivíduos provenientes de áreas afetadas e outro grupo constituído por 6 indivíduos de áreas não afetadas para cada espécie estudada, totalizando assim 60 animais no conjunto amostral (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies usadas nas análises histopatológicas e o número amostral de cada grupo (N).

Espécie	Nome comum	Número amostral (N)			
		Fígado		Brânquias	
		NA	A	NA	A
<i>Hoplias intermedius</i>	Trairão	6	6	6	6
<i>Hypostomus affinis</i>	Cascudo-man-teiga	6	6	6	6
<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	6	6	6	6
<i>Loricariichthys castaneus</i>	Cascudo-viola	6	6	6	6
<i>Oligosarcus acutirostris</i>	Lambari-bo-carra	6	6	6	6

Após a extração dos tecidos dos animais fixados em formalina a 10%, as amostras de fígado e brânquias foram preservadas em etanol a 70%. Subsequentemente, foram submetidas a uma série de lavagens sequenciais em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), seguido pelo processo de inclusão em metacrilato de glicol (Historesin®, Leica). Após a inclusão, a fim de evitar a redundância na análise dos constituintes teciduais, foram realizadas secções semi-seriadas, com uma espessura de 3µm, aproveitando um a cada dez cortes, utilizando um micrótomo rotativo (RM2265 – Leica).

As lâminas contendo secções histológicas do fígado foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) com o propósito de examinar possíveis alterações teciduais, tais como congestão vascular e processos inflamatórios, além de modificações morfológicas a nível celular, como degenerações citoplasmáticas, e alterações nucleares como hipertrofia nuclear. Adicionalmente, para a avaliação da presença de processos fibróticos no tecido hepático, as lâminas foram coradas utilizando uma solução de Sirius Red F<sub>3</sub>BA a 0,1% (Sirius Red F3B, Mobay Chemical Co., União, NJ, EUA) em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Esta abordagem permitiu a identificação e distinção das fibras de colágeno, com as fibras do tipo I adquirindo coloração vermelha e as fibras do tipo III exibindo coloração verde sob polarização. Além disso, foi empregada a coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para investigar o metabolismo hepático através da quantificação das reservas de glicogênio.

Já as lâminas que compreendem secções histológicas das brânquias foram submetidas à coloração com Azul de Toluidina com o intuito de realizar a análise de potenciais alterações estruturais. Este método permite a investigação de características como hiperplasia, hipertrofia, fusão lamelar e presença de infiltrado leucocitário nas amostras, proporcionando uma avaliação mais abrangente das características microscópicas do tecido branquial.

A observação microscópica das lâminas e a aquisição de imagens foram conduzidas utilizando o microscópio de luz modelo BX-60® (Olympus, São Paulo, Brasil), equipado com uma câmera fotográfica digital do modelo QColor-3® (Olympus, São Paulo, Brasil). Para cada secção, quinze imagens foram obtidas de maneira randomizada, com resolução de 2048 x 1536 pixels, utilizando uma objetiva de 40x para lâminas de fígado e 20x para lâminas de brânquias.

Ao todo foram produzidas 60 lâminas contendo brânquias e 180 lâminas contendo fígado. Para cada lâmina foram capturadas 10 fotografias, resultando em um conjunto total de 2.400 imagens digitalizadas. A partir dessas imagens digitalizadas, procedeu-se à contagem de diversas estruturas celulares e extracelulares, empregando uma grade composta por 300 pontos de intersecção, em conjunto com o software de análise de imagens Image Pro-plu 4.5 (Media Cybernetics®, Silver Spring, USA).

## 2.6. Análise estatística

Para a análise das concentrações de metais nas espécies coletadas, as variáveis de resposta foram submetidas a transformações logarítmicas, quando necessário, com o objetivo de mitigar a assimetria residual. Todos os modelos estatísticos adotaram a distribuição normal e foram implementados utilizando o ambiente estatístico R (R Core Team, 2022). Para investigar o efeito dos rejeitos nas concentrações dos elementos presentes no tecido muscular dos peixes, foram aplicadas análises de variância unidirecionais (ANOVA) de efeitos mistos. Essas análises foram conduzidas por meio dos pacotes estatísticos glmm TMB (MOLLIE et al., 2017), car (JOHN FOX & STANFORD WEISBERG, 2019) e ggplot2 (WICKHAM, 2016).

Na realização das análises referentes ao perfil oxidativo e histopatológico, a distribuição dos dados foi submetida ao teste de Shapiro-Wilk, empregando o software GraphPad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A comparação das médias foi efetuada por meio do teste t de Student, e os resultados foram expressos em termos de média acompanhada do erro padrão da média. O nível de significância estatística adotado foi de  $p < 0,05$ .

Para investigar as correlações propostas entre os parâmetros, nomeadamente a concentração do metal, indicadores de estresse oxidativo e alterações histopatológicas, realizou-se uma análise de correlação de Pearson, considerando um índice de significância de  $p < 0,05$ . A avaliação das correlações foi conduzida utilizando o software estatístico R (R Cores Team 2022) com o pacote Corrplot (TAIYUN & VILIAM, 2021).

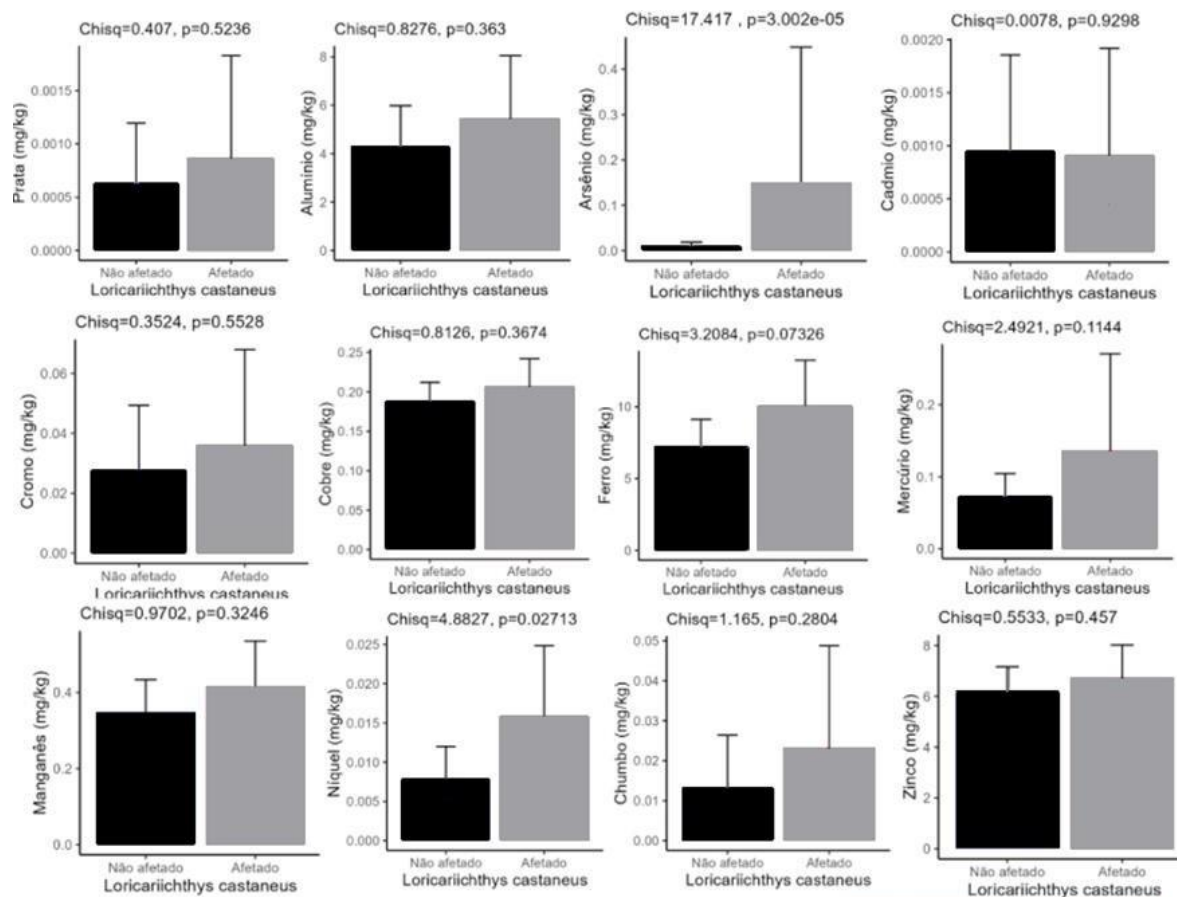
## 3. RESULTADOS

### 3.1. Concentração muscular de metais

Ao analisar individualmente cada espécie, constatou-se que *L. castaneus* exibiu as concentrações mais elevadas de arsênio (As) e níquel (Ni) em áreas afetadas (Fig.2). Em seguida, *L. alexandri* destacou-se ao exibir concentrações elevadas de arsênio (As) e ferro (Fe) (Fig.3), seguido por *H. affinis*, que registrou níveis significativamente aumentados de arsênio (As) (Fig.4), e por fim *O. acutirostris*, cujas maiores concentrações referiram-se ao cobre (Cu) (Fig.5). As análises revelaram que o arsênio foi o metal predominante nas áreas afetadas, considerando as espécies investigadas. Notavelmente, apenas a espécie *H. intermedius* não demonstrou diferença significativa entre áreas afetadas e não afetadas (Fig.6).

Figura 2. Concentrações de metais (mg/kg) no músculo de espécimes de *Loricariichthys castaneus* coletados na Bacia do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de

rejeitos. As diferenças estatísticas estão marcadas com (\*)  $P < 0,05$  na tabela. Apenas As e Ni apresentaram diferenças significativas comparando áreas afetadas e não afetadas.



### *Loricariichthys castaneus*



Metal	Analysis of Deviance	
Metal	Chisq	Pr(>Chisq)
Ag	0.4068	0.5236
Al	0.8276	0.363
As	17.417	3.002e-05 ***
Cd	0.0078	0.9298
Cr	0.3524	0.5528
Cu	0.8126	0.3674
Fe	3.2084	0.07326
Hg	2.4921	0.1144
Mn	0.9702	0.3246
Ni	4.8827	0.02713 *
Pb	1.165	0.2804
Zn	0.5533	0.457

Figura 3. Concentrações de metais (mg/kg) no músculo de espécimes de *Lophiosilurus alexandri* coletados na Baía do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de rejeitos. As diferenças estatísticas estão marcadas com (\*)  $P < 0,05$  na tabela. Apenas As e Fe apresentaram diferenças significativas comparando áreas afetadas e não afetadas.

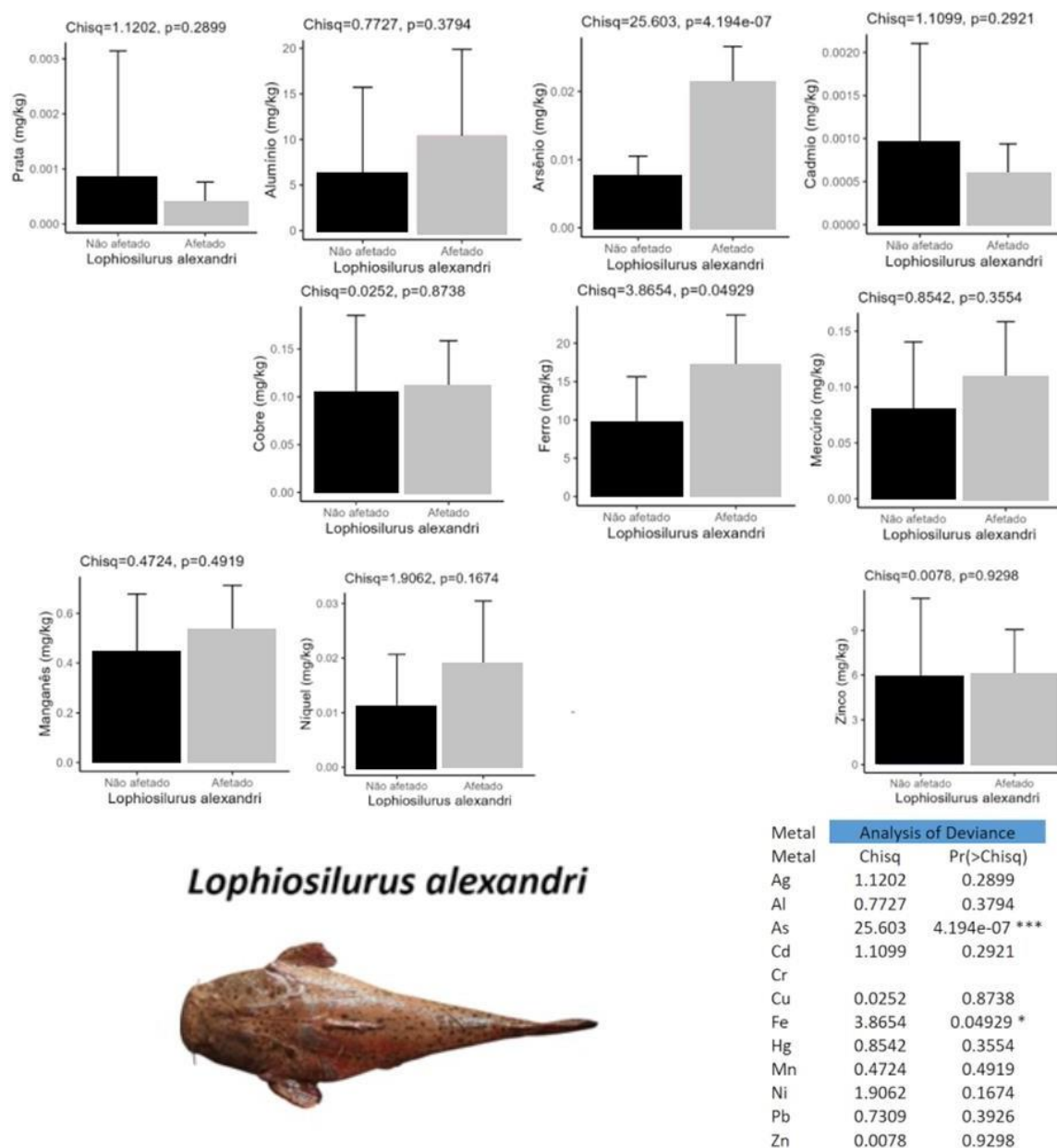
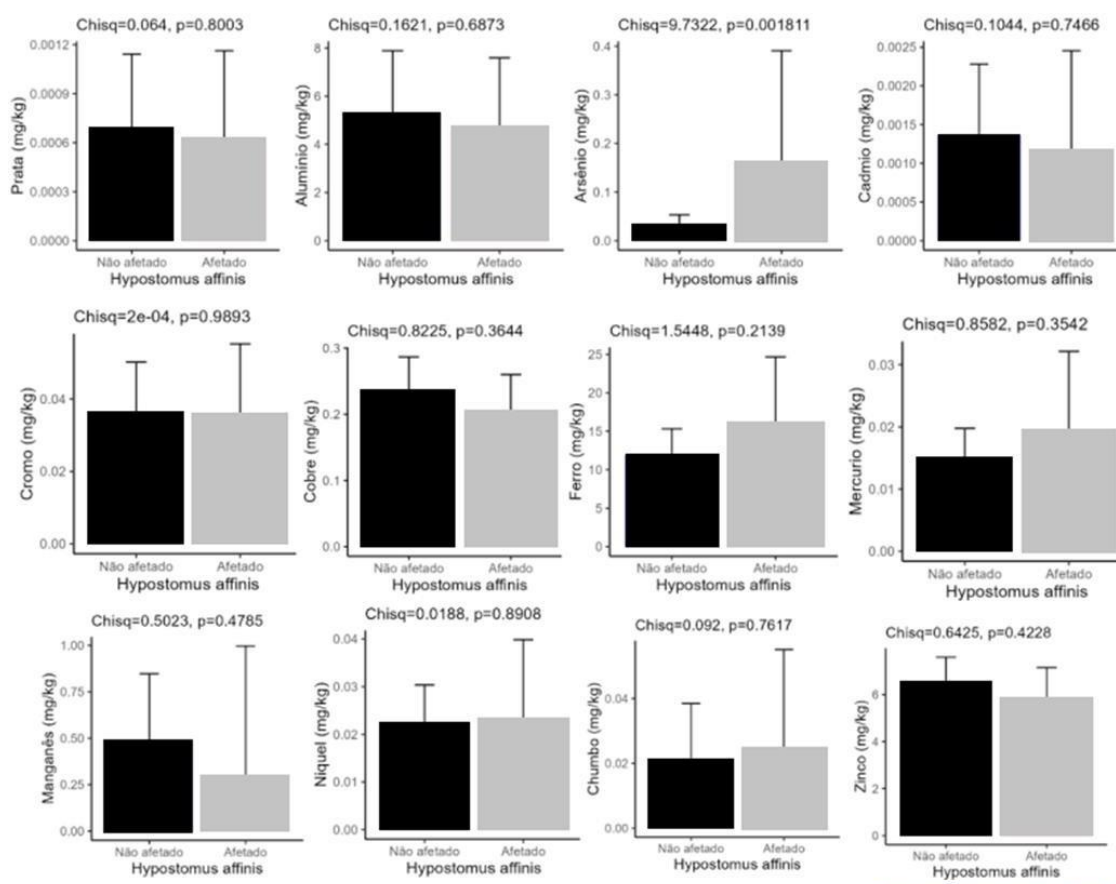


Figura 4. Concentrações de metais (mg/kg) no músculo de espécimes de *Hypostomus affinis* coletados na Baía do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de rejeitos. As diferenças estatísticas estão marcadas com (\*)  $P < 0,05$  na tabela. Apenas As apresentou diferença significativa comparando áreas afetadas e não afetadas.



### *Hypostomus affinis*



Metal	Analysis of Deviance	
	Chisq	Pr(>Chisq)
Ag	0.064	0.8003
Al	0.1621	0.6873
As	9.7322	0.001811 **
Cd	0.1044	0.7466
Cr	2.00E-04	0.9893
Cu	0.8225	0.3644
Fe	1.5448	0.2139
Hg	0.8582	0.3542
Mn	0.5023	0.4785
Ni	0.0188	0.8908
Pb	0.092	0.7617
Zn	0.6425	0.4228

Figura 5. Concentrações de metais (mg/kg) no músculo de espécimes de *Oligosarcus acutirostris* coletados na Bacia do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de rejeitos. As diferenças estatísticas estão marcadas com (\*)  $P < 0,05$  na tabela. Apenas Cu apresentou diferença significativa comparando áreas afetadas e não afetadas.

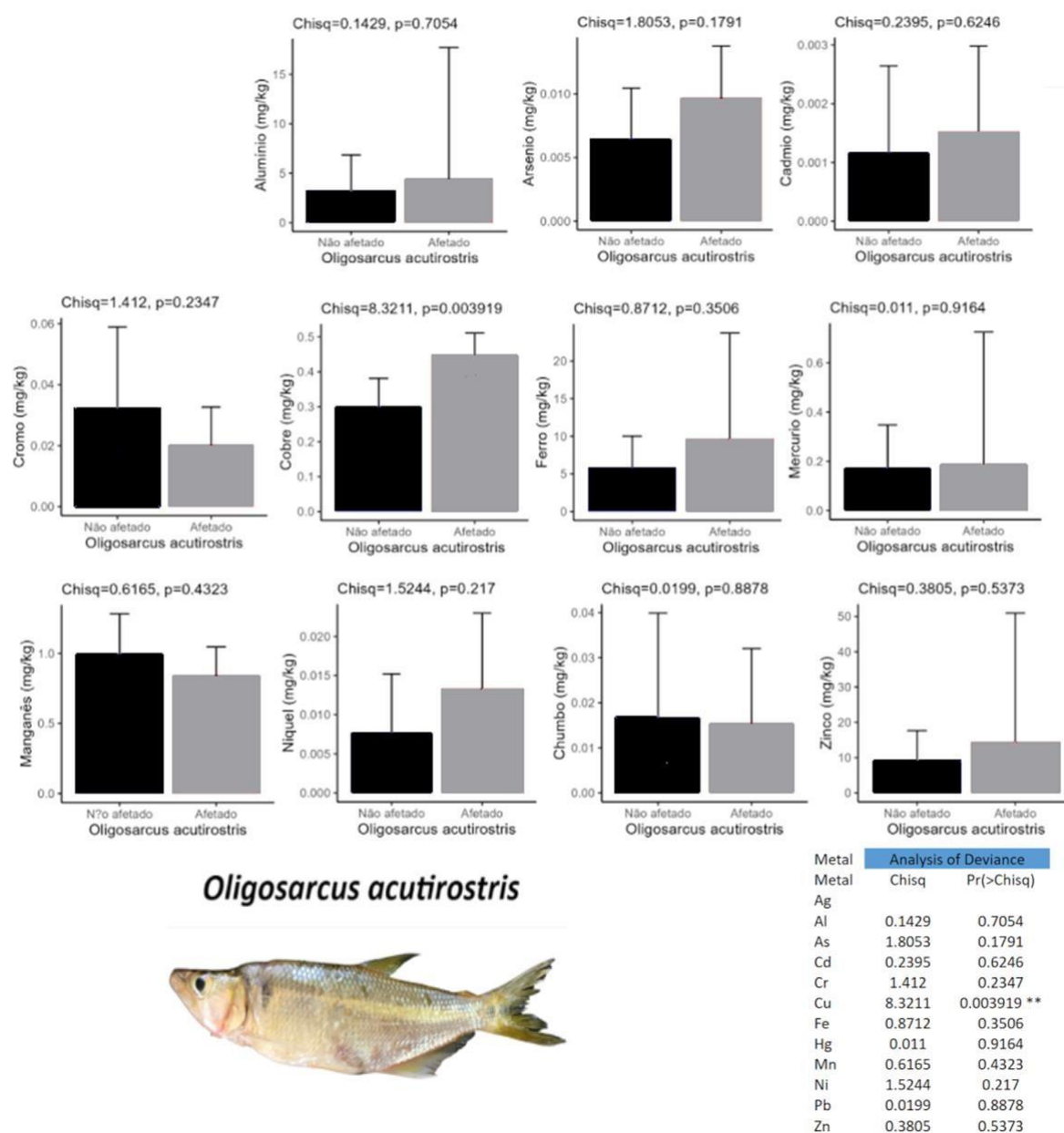
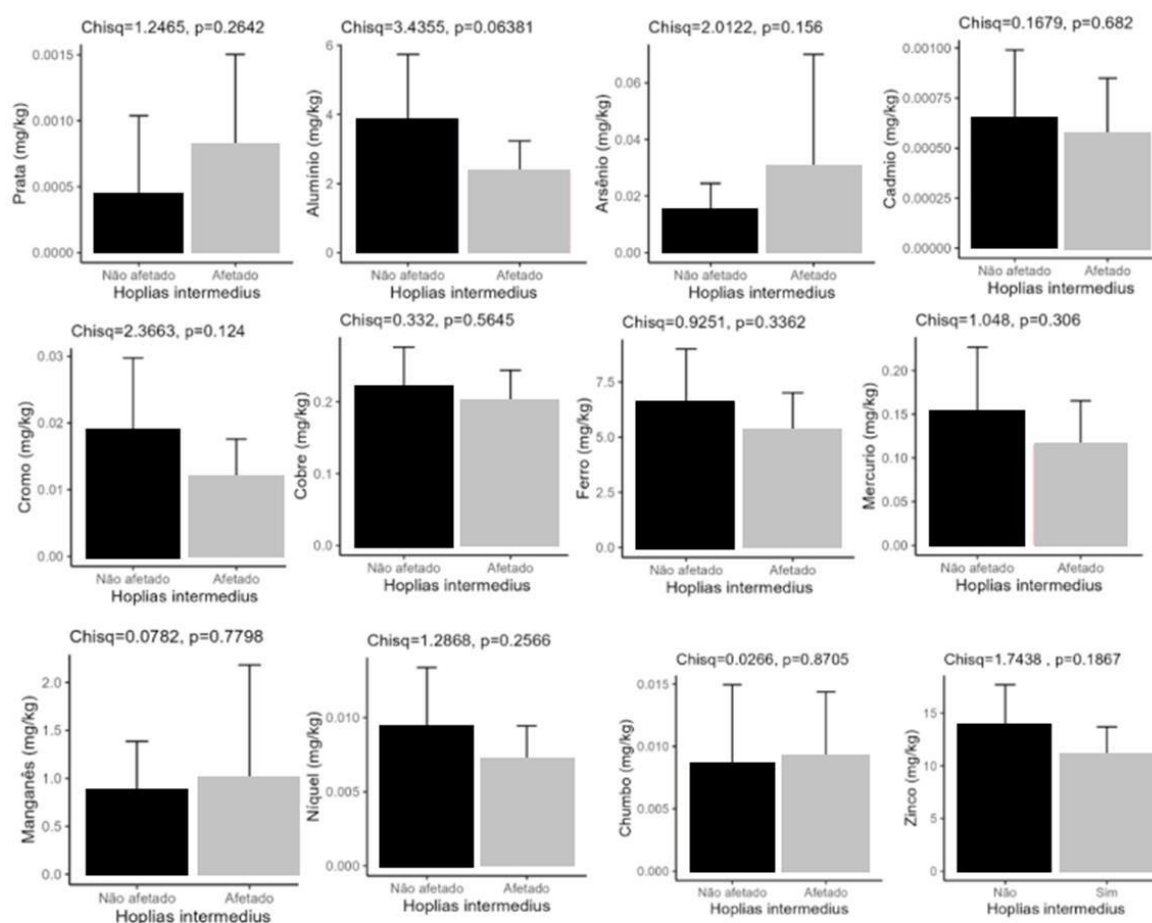


Figura 6. Concentrações de metais (mg/kg) no músculo de espécimes de *Hoplias intermedius* coletados na Baía do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de rejeitos. As diferenças estatísticas estão marcadas com (\*)  $P < 0,05$  na tabela. Não houve diferença significativa comparando áreas afetadas e não afetadas.



### *Hoplias intermedius*



Metal	Analysis of Deviance	
Metal	Chisq	Pr(>Chisq)
Ag	1.2465	0.2642
Al	3.4355	0.06381
As	2.0122	0.156
Cd	0.1679	0.682
Cr	2.3663	0.124
Cu	0.332	0.5645
Fe	0.9251	0.3362
Hg	1.048	0.306
Mn	0.0782	0.7798
Ni	1.2868	0.2566
Pb	0.0266	0.8705
Zn	1.7438	0.1867

## 3.2. Avaliação do estresse oxidativo

Todas as comparações foram feitas entre o grupo afetado e o grupo não afetado. Abaixo é possível observar os resultados de acordo com o órgão analisado.

### 3.2.1. Fígado

Em relação aos parâmetros hepáticos, foi observado um aumento significativo na concentração de proteínas carboniladas (PC) em *Hypostomus affinis* ( $P=0,0087$ ) (Fig.7). Por sua vez, *Lophosilurus alexandri* apresentou níveis elevados de óxido nítrico (NO) ( $P = 0,0269$ ) e baixa atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) ( $P = 0,0166$ ) (Fig.8). Da mesma forma, *Loricariichthys castaneus* exibiu concentrações elevadas de NO ( $P = 0,0437$ ) (Fig.9). Em relação ao *Oligosarcus acutirostris*, foram identificados níveis elevados de malondialdeído (MDA) ( $P = 0,0292$ ) e SOD ( $P = 0,0231$ ), associados a baixos níveis de PC ( $P = 0,0400$ ) (Fig.10). Por fim, a espécie

*Hoplias intermedius* não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Fig.11).

Figura 7. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no fígado de espécimes de cascudo-manteiga *Hypostomus affinis* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutathiona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

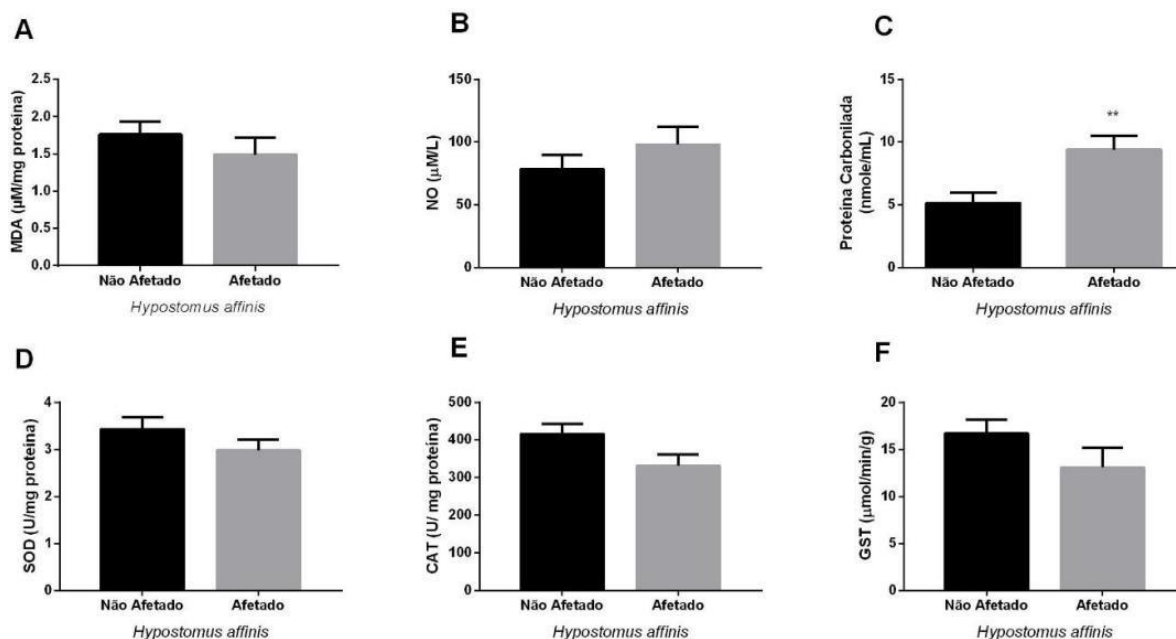


Figura 8. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no fígado do pacumã *Lophiosilurus alexandri* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutathiona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM

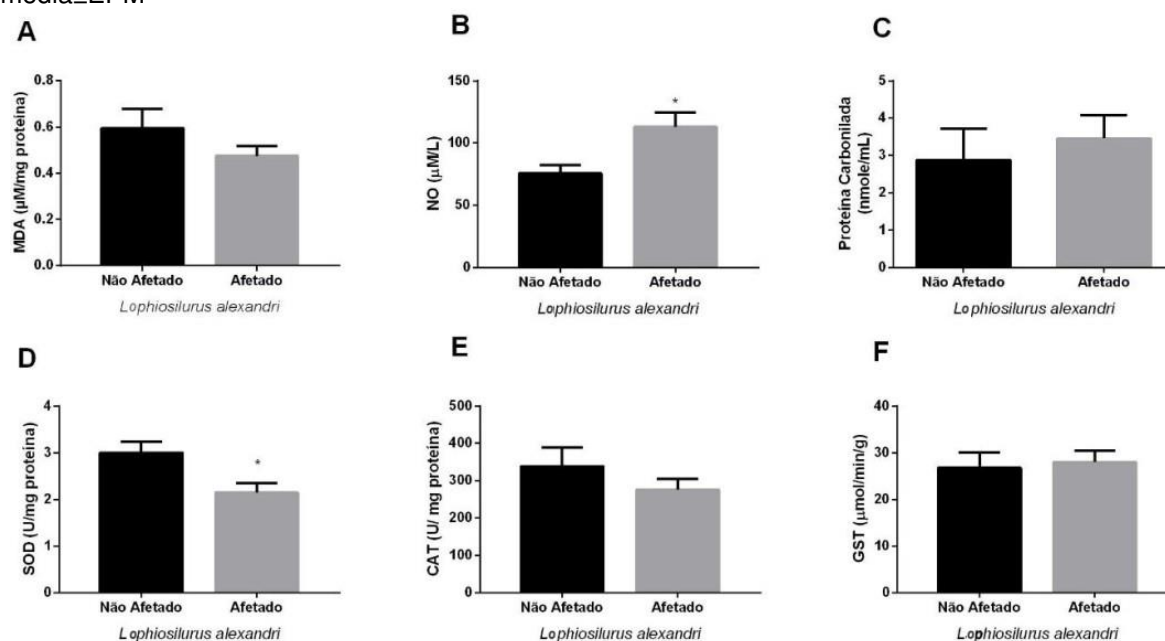


Figura 9. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no fígado do cascudo-viola *Loricariichthys castaneus* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM

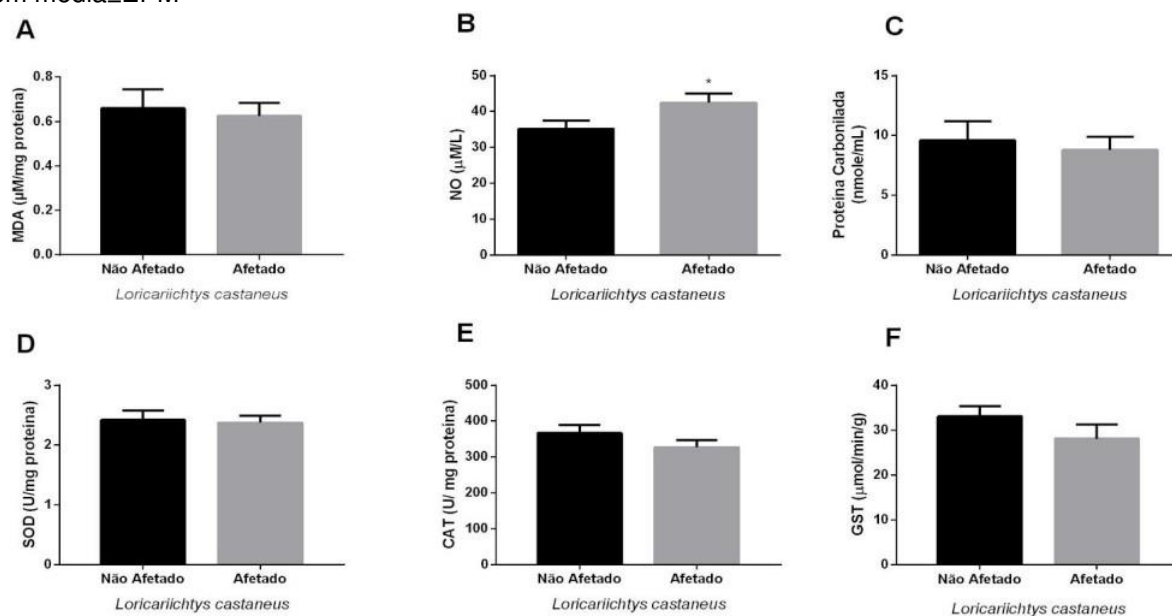


Figura 10. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no fígado do lambari-bocarra *Oligosarcus acutirostris* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM

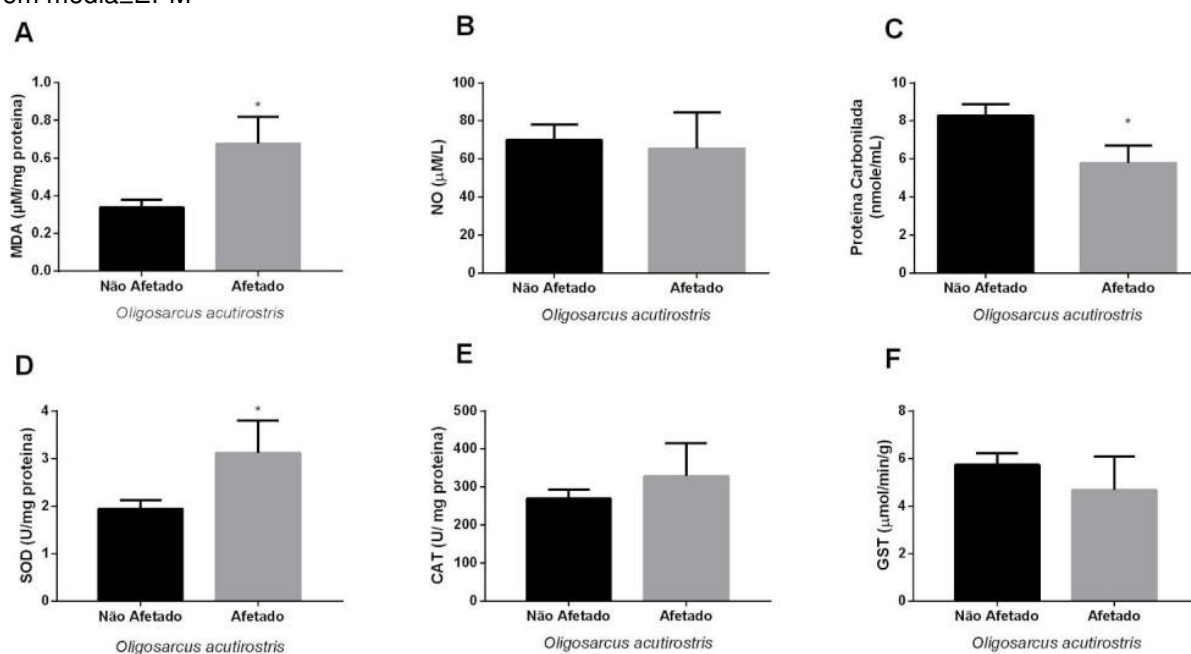
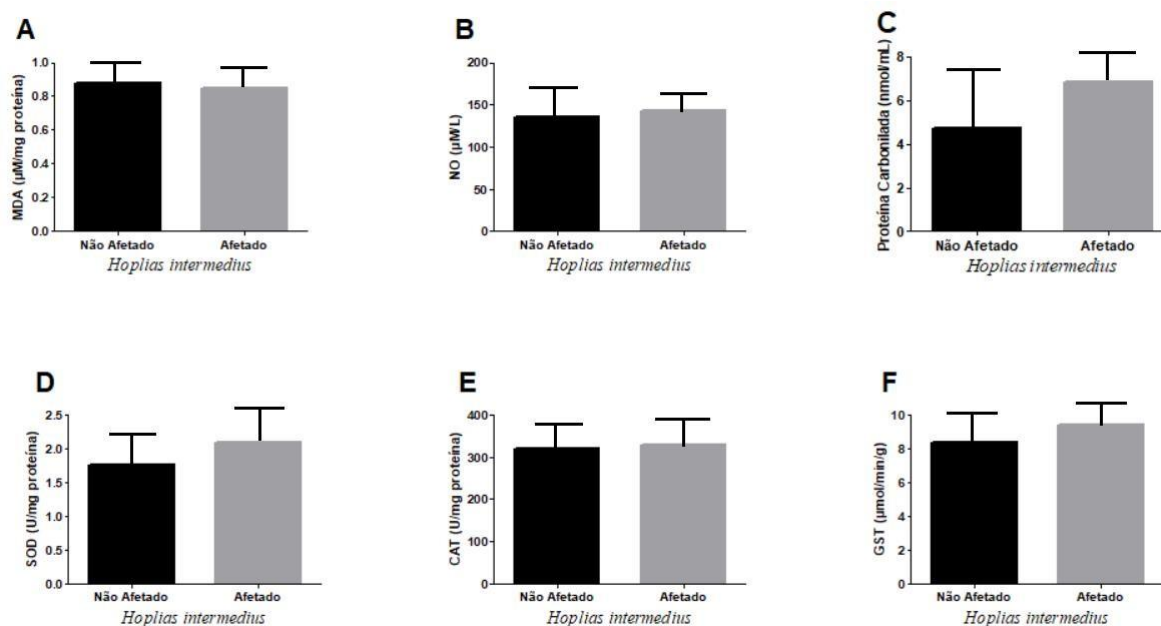


Figura 11. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no fígado do trairão *Hoplias intermedius* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-

Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM



### 3.2.2. Brânquias

Nas estruturas branquiais do peixe *Hoplias intermedius* observou-se um aumento significativo nos níveis de óxido nítrico (NO) ( $P = 0,0064$ ), proteínas carboniladas (PC) ( $P = 0,0088$ ) e glutathiona-S-transferase (GST) ( $P = 0,0366$ ) (Fig.12). De maneira análoga, o exemplar de peixe cascudo-manteiga, *Hypostomus affinis*, apresentou notável elevação nos teores de NO ( $P = 0,0378$ ), PC ( $P = 0,0006$ ) e GST ( $P < 0,0001$ ) (Fig.13). Nas brânquias do pacamã, *Lophiosilurus alexandri*, verificou-se um aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA) ( $P = 0,0226$ ), NO ( $P = 0,0362$ ) e GST ( $P = 0,0347$ ) (Fig. 14). Para o cascudo-viola, *Loricariichthys castaneus*, constatou-se um aumento nos níveis de MDA ( $P = 0,0052$ ), PC ( $P = 0,0096$ ), superóxido dismutase (SOD) ( $P = 0,0352$ ) e GST ( $P = 0,0002$ ) (Fig.15). No que concerne ao lambari-bocarra, *Oligosarcus acutirostris*, evidenciaram-se níveis elevados de NO ( $P = 0,0134$ ), SOD ( $P = 0,0411$ ) e catalase (CAT) ( $P = 0,0122$ ) (Fig.16).

Figura 12. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias do trairão *Hoplias intermedius* coletados em regiões afetadas e não afetadas na Bacia do Rio Doce pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutathiona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

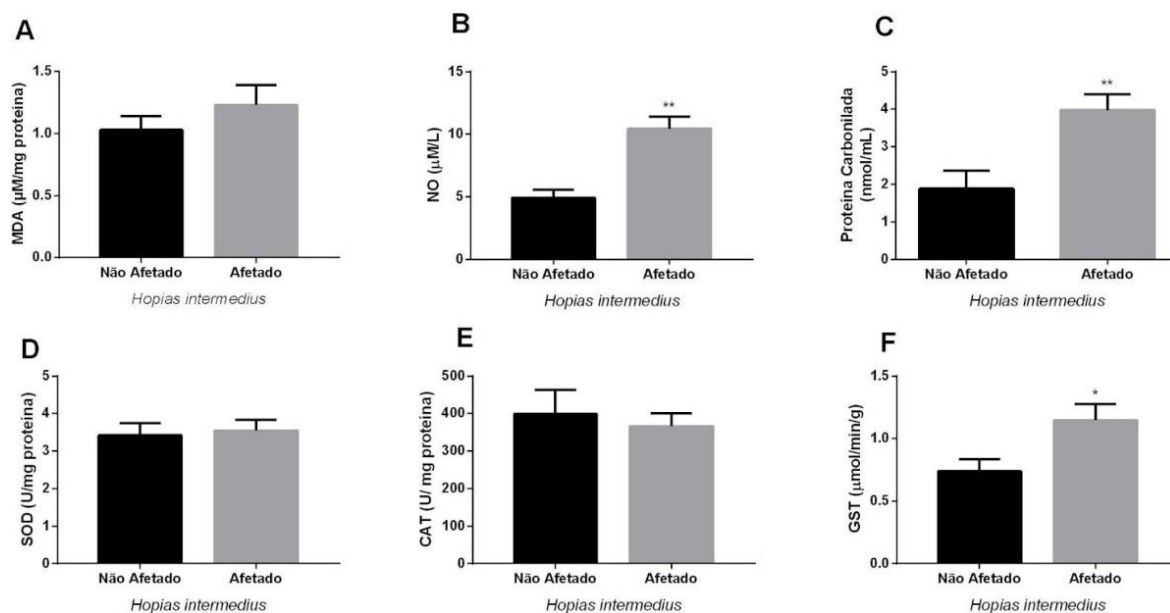


Figura 13. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias do cascudo-manteiga *Hoplosternum littorale* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

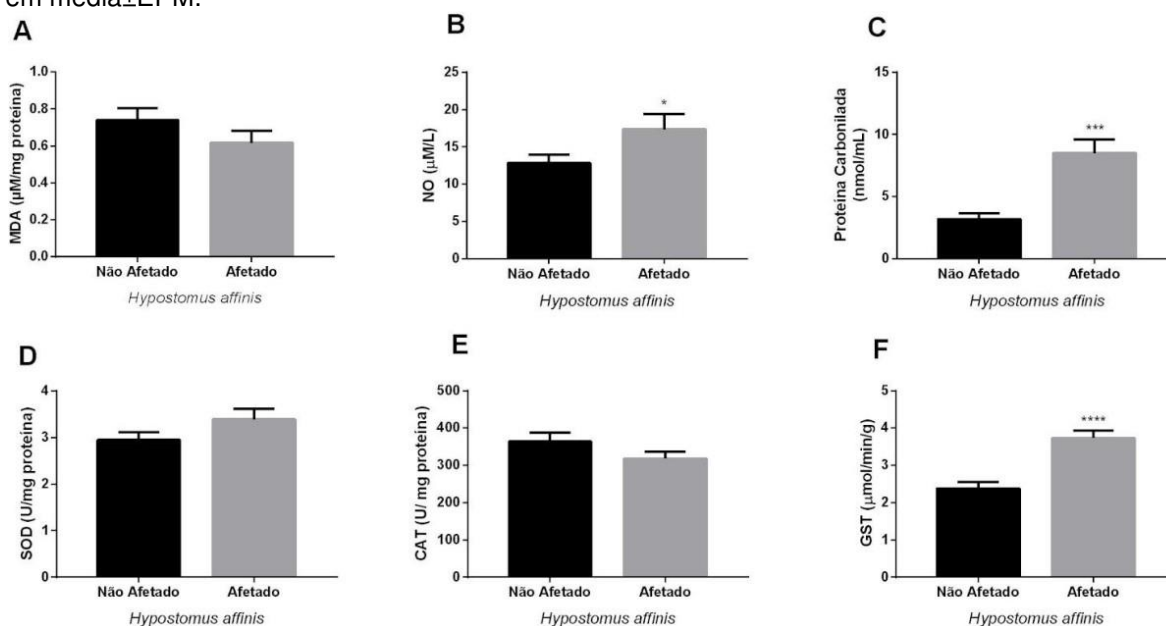


Figura 14. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias do pacamã *Lophiosilurus alexandri* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

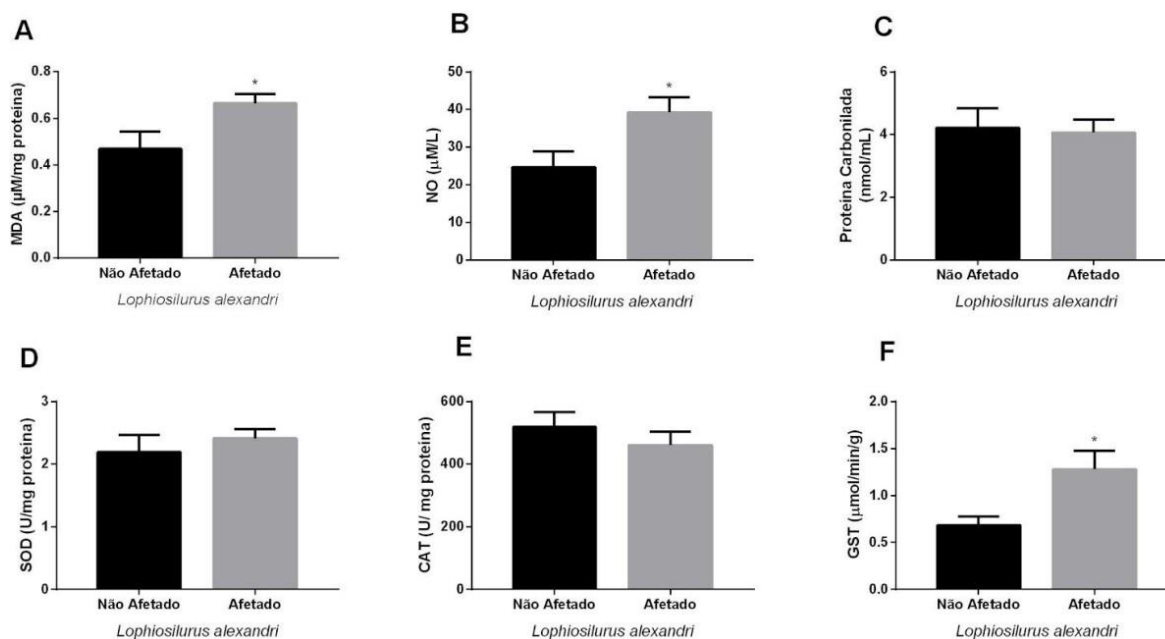


Figura 15. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias do cascudo-viola *Lophiosilurus alexandri* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

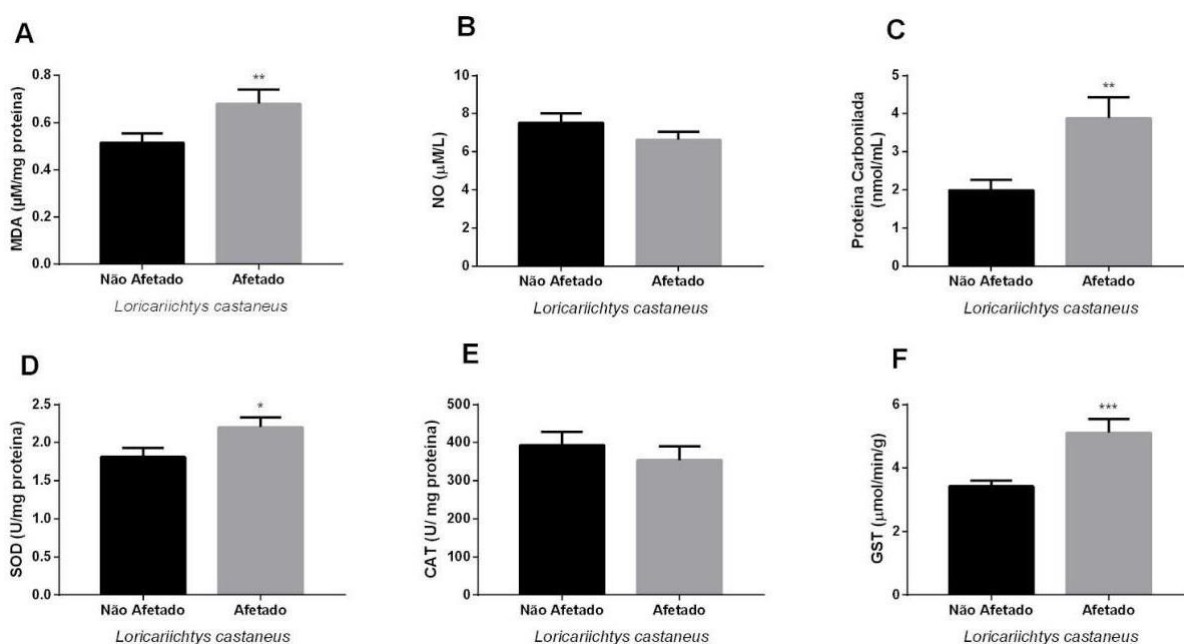
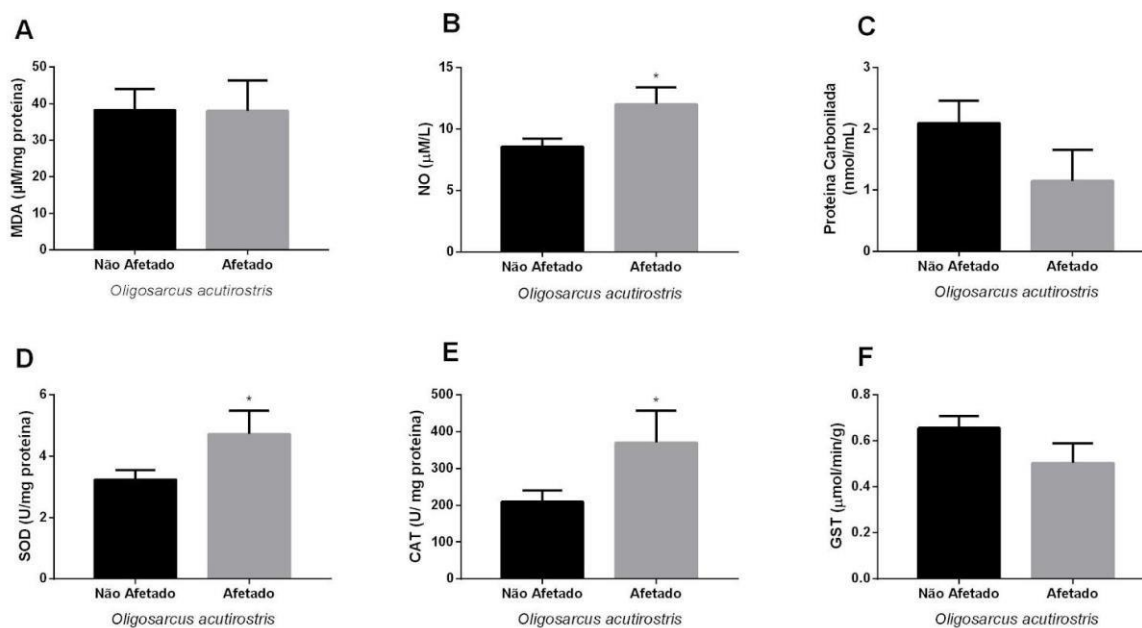


Figura 16. Concentração dos marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias do lambari-bocarra *Oligosarcus acutirostris* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Malondialdeído - MDA, (B) Óxido Nítrico - NO, (C) Proteína Carbonilada, (D) Superóxido Dismutase - SOD, (E) Catalase - CAT, (F) Glutaciona-S-Transferase - GST. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.



### 3.3. Avaliações histopatológicas

Todas as comparações foram feitas entre o grupo afetado e o grupo não afetado. Abaixo é possível observar os resultados de acordo com o órgão analisado.

#### 3.3.1. Fígado

##### 3.3.1.1. Principais alterações morfofisiológicas

Entre as diversas patologias identificadas no tecido hepático (Fig.17), merecem destaque a esteatose hepática e a congestão vascular, as quais emergiram como as alterações de maior incidência entre as espécies estudadas. Neste contexto, as espécies *Hypostomus affinis* e *Lophiosilurus alexandri* apresentaram um aumento significativo de esteatose e congestão vascular no tecido hepático, como mostrado nas figuras 18 e 19, respectivamente. Além disso, a espécie *Hoplias intermedius* também revelou um acréscimo na prevalência de congestão vascular no fígado (Fig.20). Em contraste, as espécies *Oligosarcus acutirostris* e *Loricariichthys castaneus* não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos examinados, como exposto nas figuras 21 e 22, respectivamente.

Figura 17. Fotomicrografias representativas de diferentes histopatologias identificadas no fígado de diferentes espécies de peixes, coletados na Bacia do Rio Doce pós rompimento da barragem de rejeitos. (A) Fígado normal; (B) Esteatose hepática (seta preta); (C) Congestão vascular (\*); (D) Infiltrado leucocitário (círculo preto) e pigmento de hemossiderina (seta tracejada); (E) Dilatação dos sinusoides. Coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.). Objetiva de 40x. Barra = 20µm.

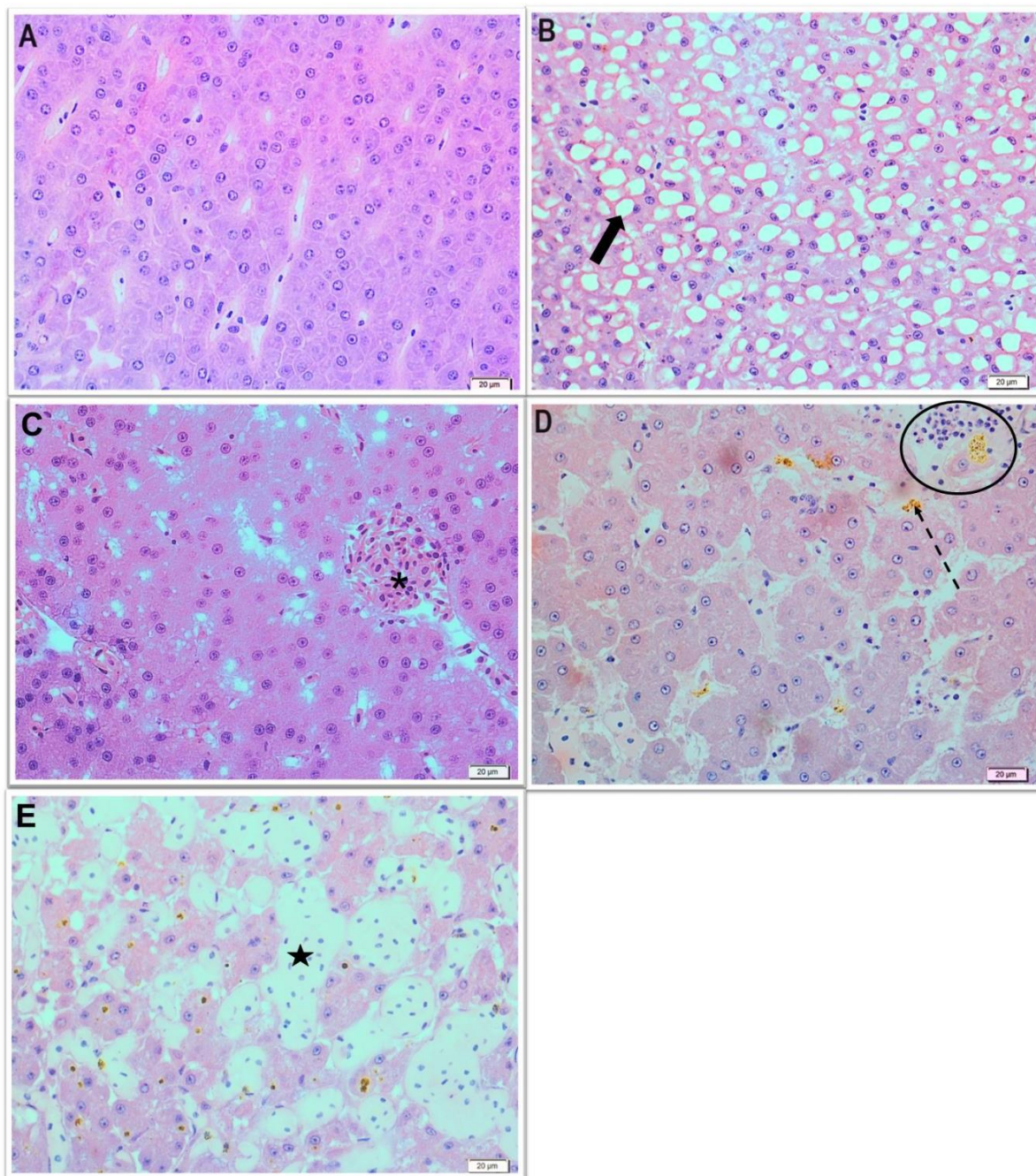


Figura 18. Percentual das principais histopatologias encontradas no fígado de espécimes de *Hypostomus affinis* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Esteatose, (B) Congestão vascular. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

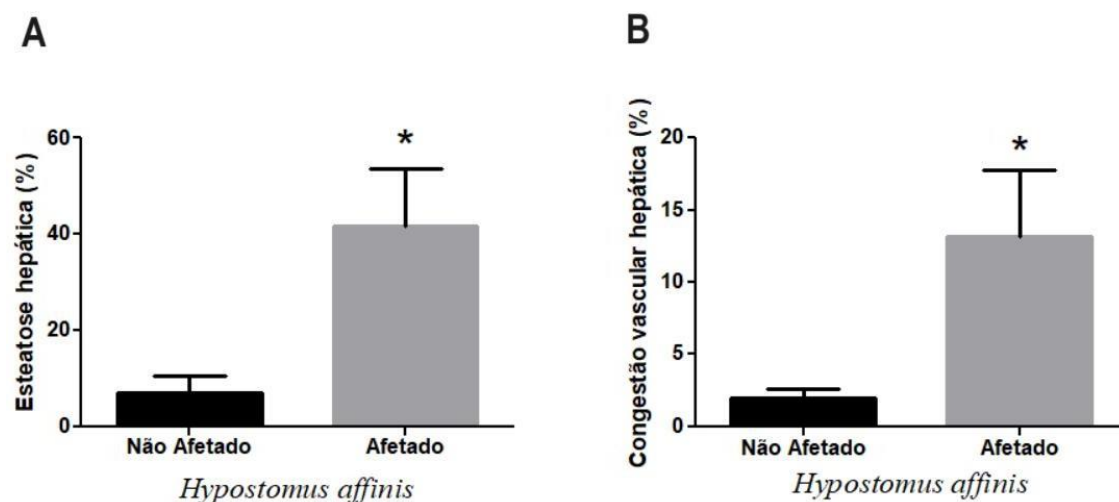


Figura 19. Percentual das principais histopatologias encontradas no fígado de espécimes de *Lophiosilurus alexandri* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Esteatose, (B) Congestão vascular. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

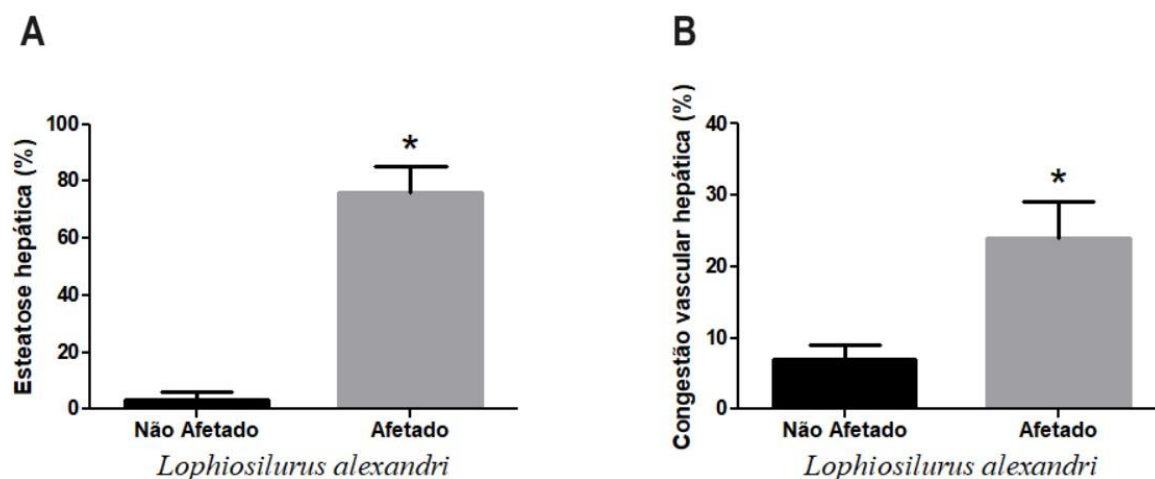


Figura 20. Percentual das principais histopatologias encontradas no fígado de espécimes de *Hoplias intermedius* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Esteatose, (B) Congestão vascular. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

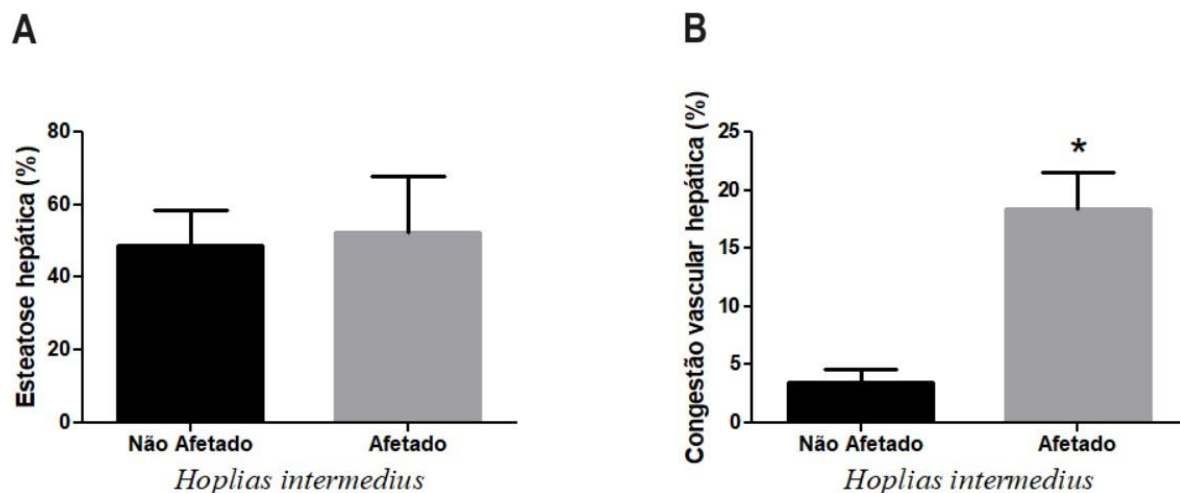


Figura 21. Percentual das principais histopatologias encontradas no fígado de espécimes de *Oligosarcus acutirostris* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Esteatose, (B) Congestão vascular. Não houve diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

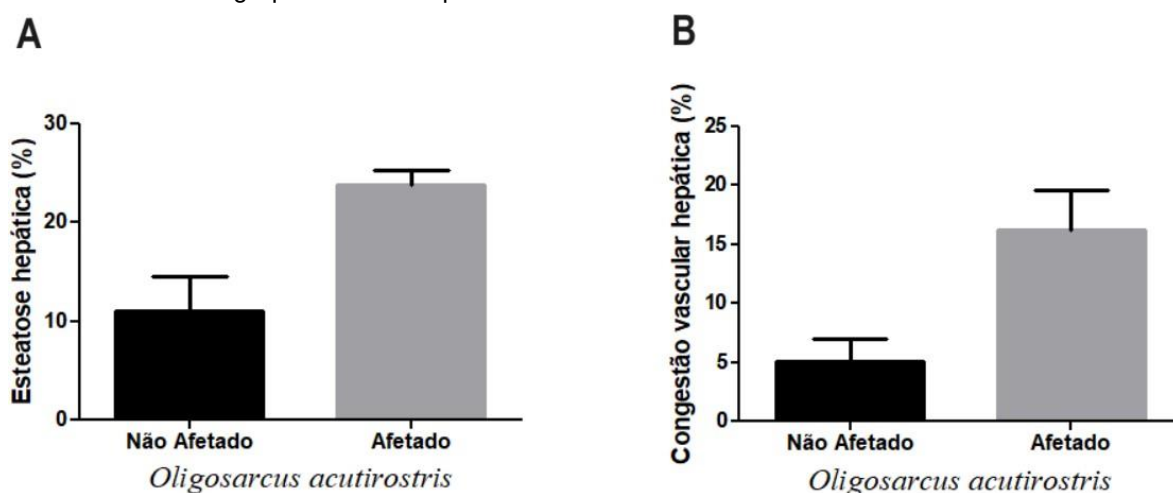
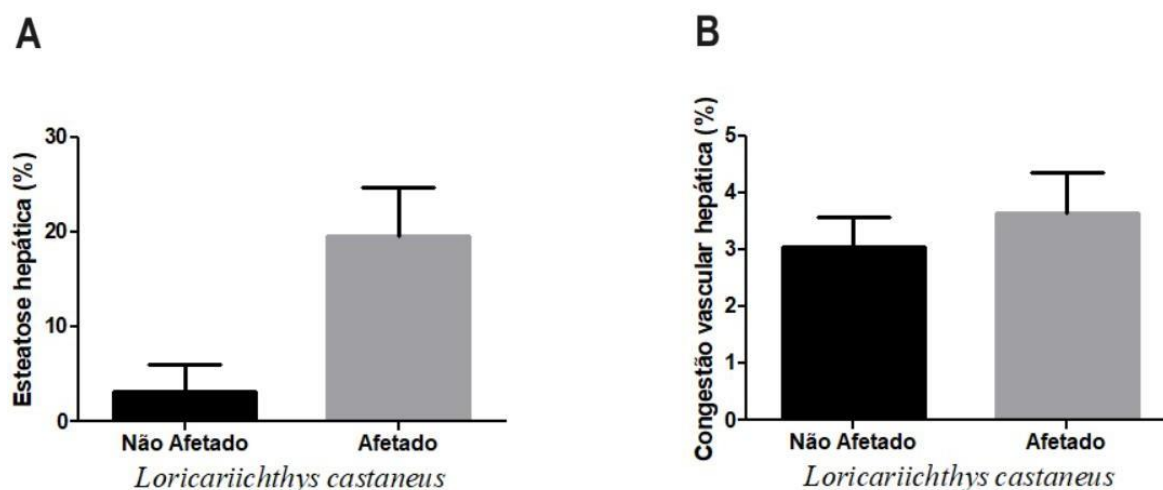


Figura 22. Percentual das principais histopatologias encontradas no fígado de espécimes de *Loricariichthys castaneus* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Esteatose, (B) Congestão vascular. Não houve diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.



### 3.3.1.2. Fibrose hepática

Dentre todas as espécies examinadas, apenas *Lophiosilurus alexandri* apresentou aumento significativo na densidade volumétrica de colágeno, sugerindo um processo fibrótico no tecido hepático (Fig.23 e 24-A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas demais espécies estudadas (*Hypostomus affinis*, *Hoplias intermedius*, *Oligosarcus acutirostris* e *Loricariichthys castaneus*), como exposto na Figura 24 (B, C, D e E, respectivamente).

Figura 23. Representação da densidade volumétrica de colágeno encontrado no fígado de espécimes de *Lophiosilurus alexandri* coletados na Bacia do Rio Doce pós rompimento da barragem de rejeitos. Fotomicrografias obtidas usando objetiva de 40x após coloração com Picro-Sirius. (A) Fibras vermelhas: (colágeno tipo I), (B) Fibras verdes: (colágeno tipo III). Barra = 20µm

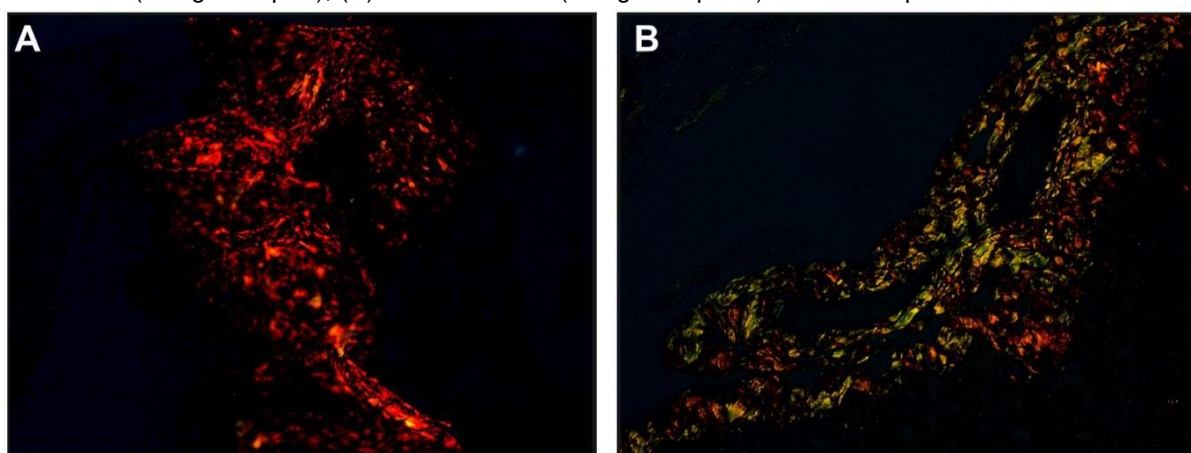
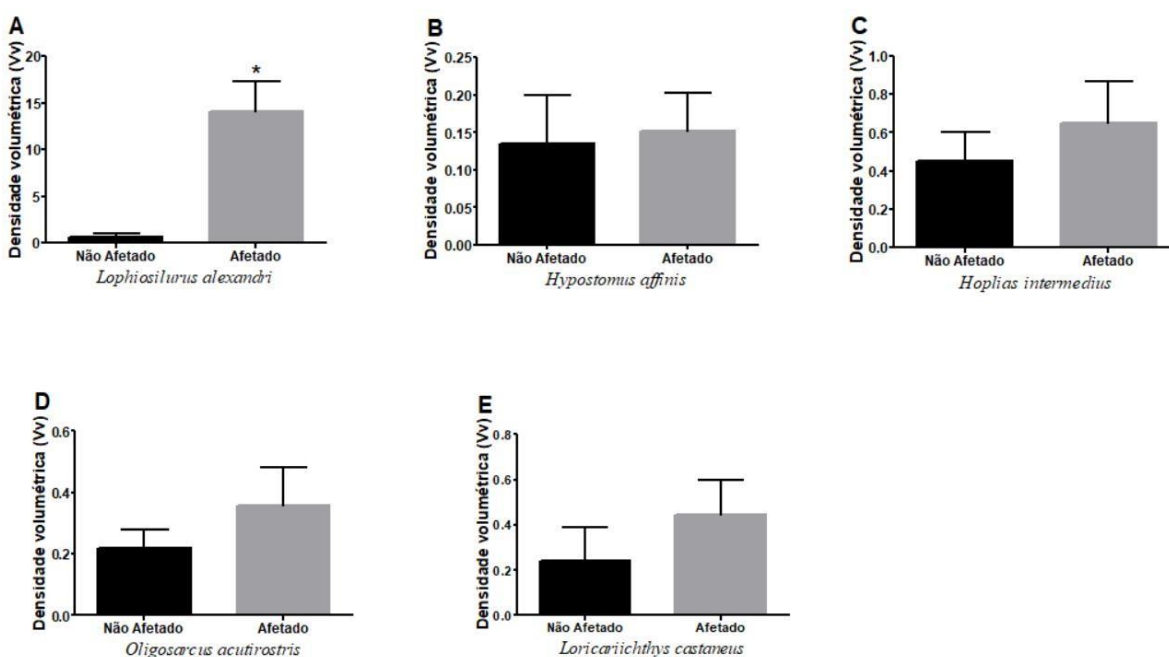


Figura 24. Percentual da densidade volumétrica de colágeno encontrada no fígado de diferentes espécies de peixes coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) *Lophiosilurus alexandri*, (B) *Hypostomus affinis*, (C) *Hoplias intermedius*, (D) *Oligosarcus acutirostris*, (E) *Loricariichthys castaneus*. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.



### 3.3.1.3. Glicogênio hepático

Com o propósito de avaliar o metabolismo hepático, procedeu-se à análise quantitativa das reservas de glicogênio (Fig.25). Os resultados obtidos não revelaram diferenças estatisticamente significativas na quantidade de glicogênio entre os grupos amostrados (Fig.26).

Figura 25. Fotomicrografias do fígado de *Hoplias intermedius* obtidas usando objetiva de 40x após coloração de Ácido Período de Schiff (PAS) para identificação de glicogênio. O glicogênio nessa coloração se apresenta como acúmulos na cor púrpura dentro das células hepáticas. (A) Animal de área afetada, (B) Animal de área não afetada; coletados na Bacia do Rio Doce pós rompimento da barragem de rejitos.

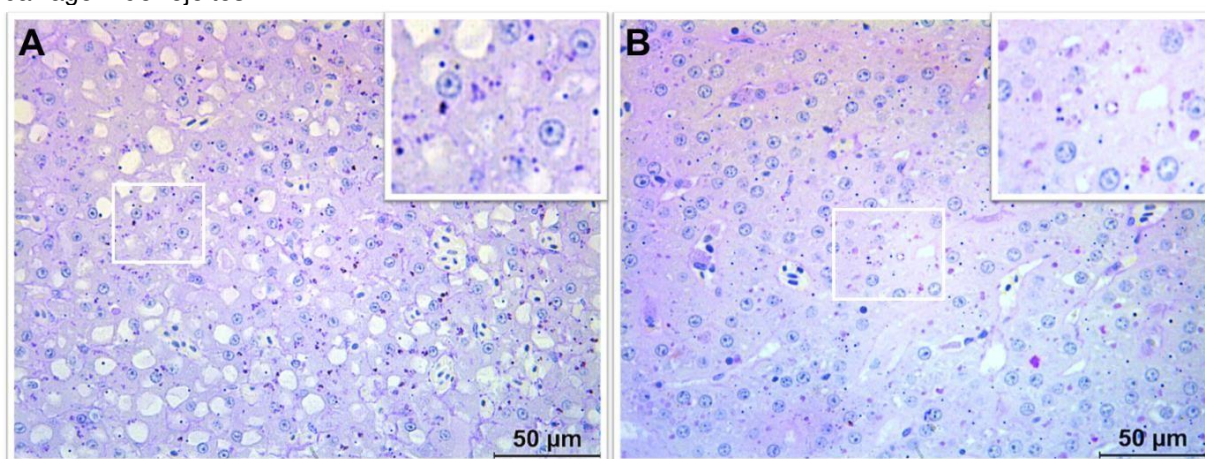
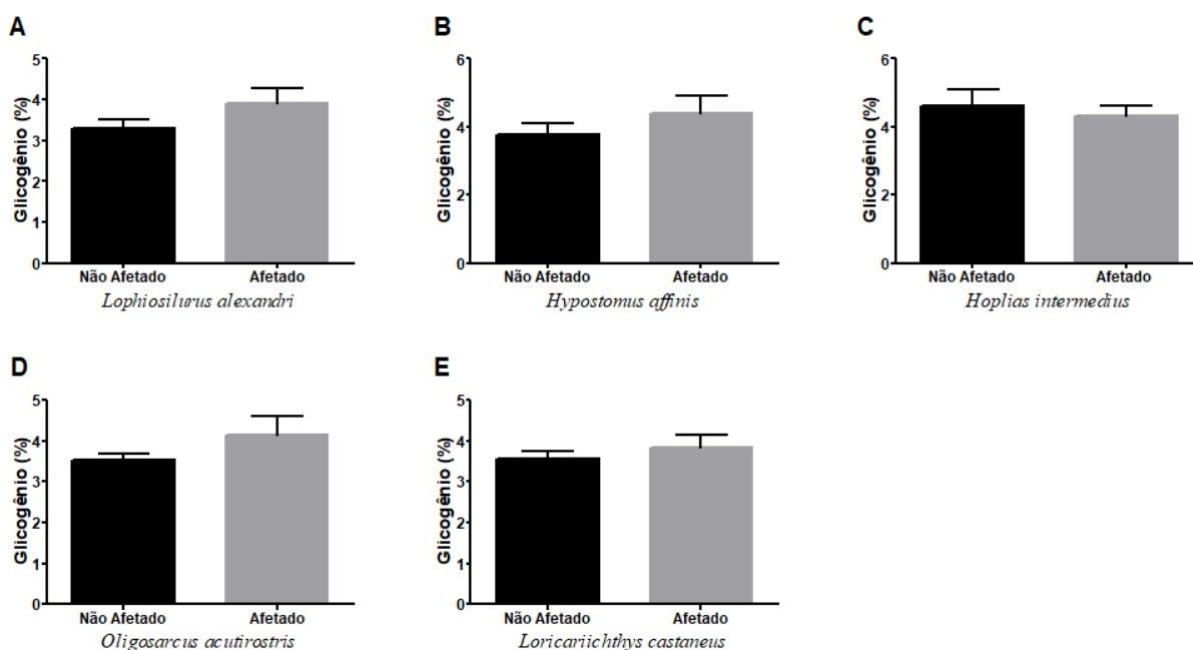


Figura 26. Percentual de glicogênio no fígado de diferentes espécies de peixes coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas. (A) *Lophiosilurus alexandri*, (B) *Hypostomus affinis*, (C) *Hoplias intermedius*, (D) *Oligosarcus acutirostris*, (E) *Loricariichthys castaneus*. Não houve diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.



### 3.3.2. Brânquias

Entre as patologias identificadas nas brânquias (Fig.27), merecem destaque a hiperplasia interlamelar e a fusão lamelar, as quais emergiram como as alterações de maior incidência entre as espécies estudadas. Entre as cinco espécies objeto de estudo – *Hypostomus affinis*, *Oligosarcus acutirostris*, *Loricariichthys castaneus* e *Lophosilurus alexandri* – observou-se um aumento notável na taxa de incidência de fusão lamelar, como mostrado nas Figuras 28, 29, 30 e 31, respectivamente. *Hoplias intermedius*, por sua vez, foi a única espécie que não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos de localidades não afetadas e afetadas (Fig.32). Quanto à hiperplasia interlamelar, destaca-se que somente a espécie *Loricariichthys castaneus* manifestou diferença significativa entre os grupos de áreas não afetadas e afetadas (Fig.30).

Figura 27. Fotomicrografias representativas de diferentes histopatologias identificadas nas brânquias de diferentes espécies de peixes coletados na Bacia do Rio Doce pós rompimento da barragem de rejeitos. (A) Brânquia normal; (B) Fusão lamelar (\*); (C) Hiperplasia interlamelar (seta preta); (D) Aneurisma calcificado (seta tracejada). Coloração Azul de toluidina. Objetiva de 20x. Barra = 60µm

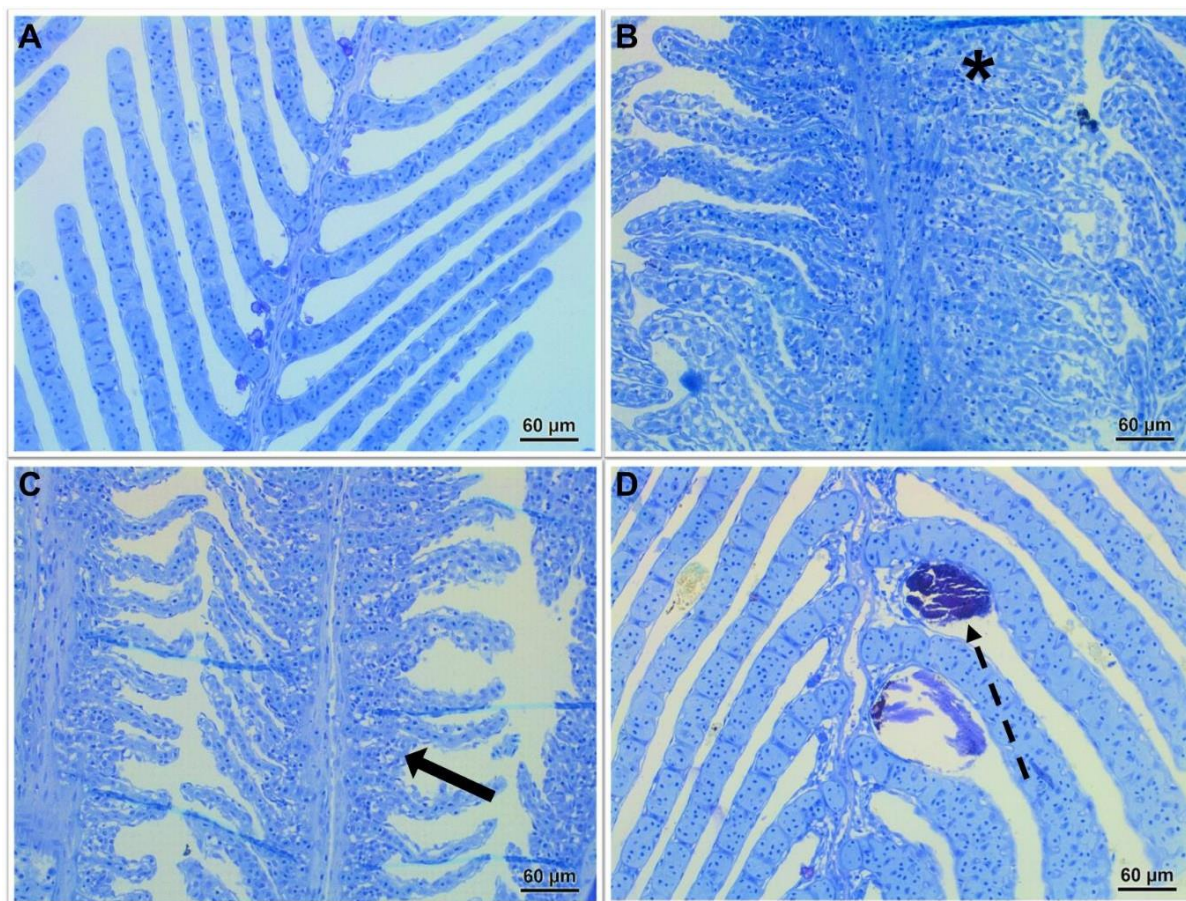


Figura 28. Percentual das principais histopatologias encontradas nas brânquias de espécimes de *Hypostomus affinis* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Fusão lamelar, (B) Hiperplasia interlamelar. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

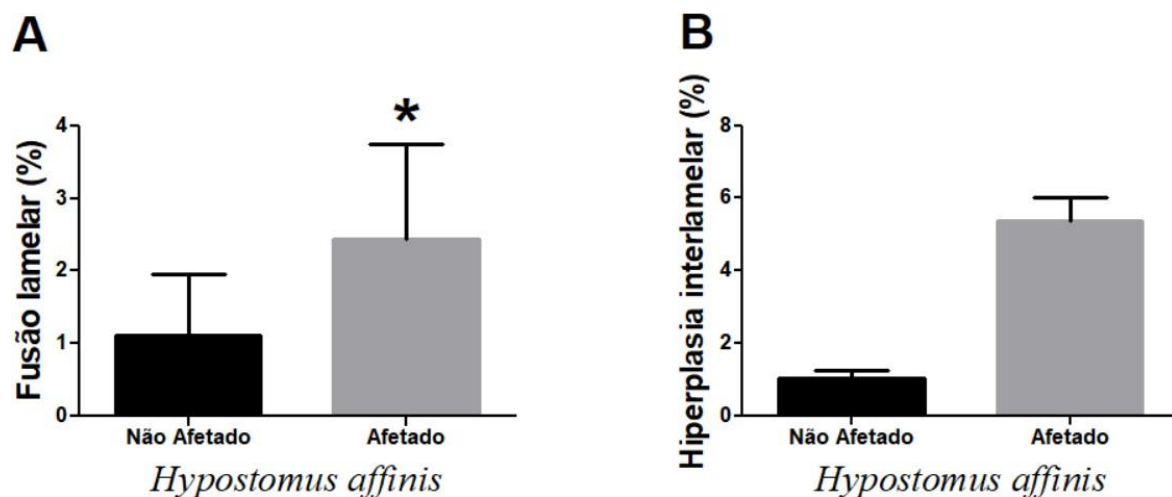


Figura 29. Percentual das principais histopatologias encontradas nas brânquias de espécimes de *Oligosarcus acutirostris* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Fusão lamelar, (B) Hiperplasia interlamelar. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

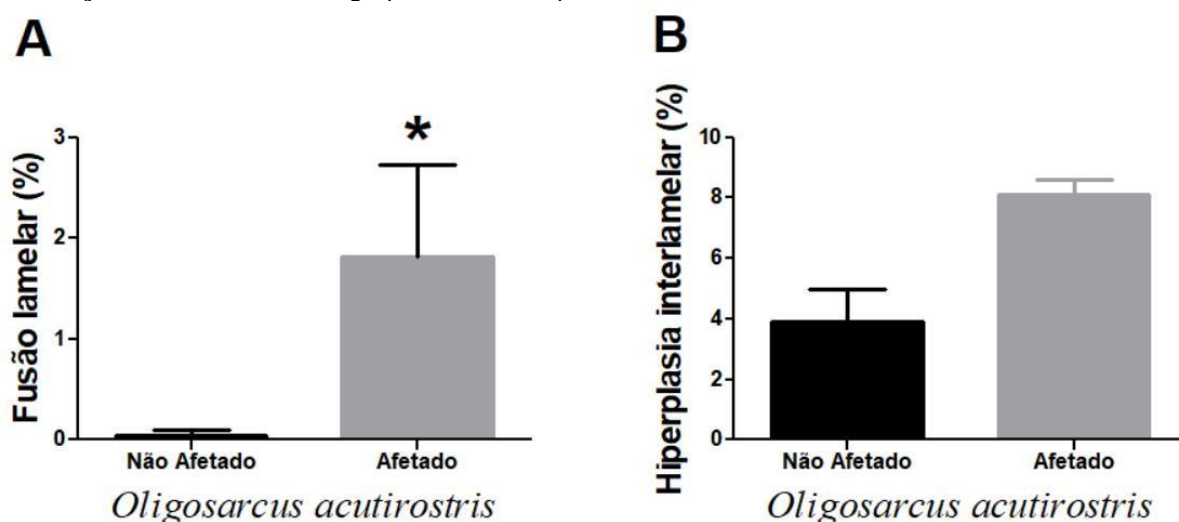


Figura 30. Percentual das principais histopatologias encontradas nas brânquias de espécimes de *Loricariichthys castaneus* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Fusão lamelar, (B) Hiperplasia interlamelar. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

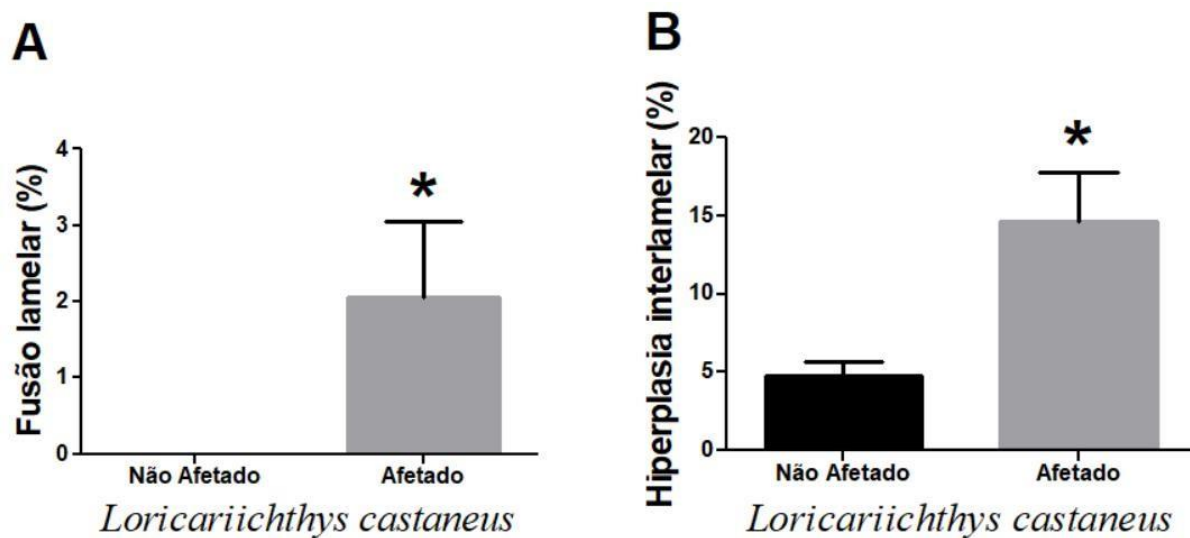


Figura 31. Percentual das principais histopatologias encontradas nas brânquias de espécimes de *Lophiosilurus alexandri* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Fusão lamelar, (B) Hiperplasia interlamelar. \* Representa diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.

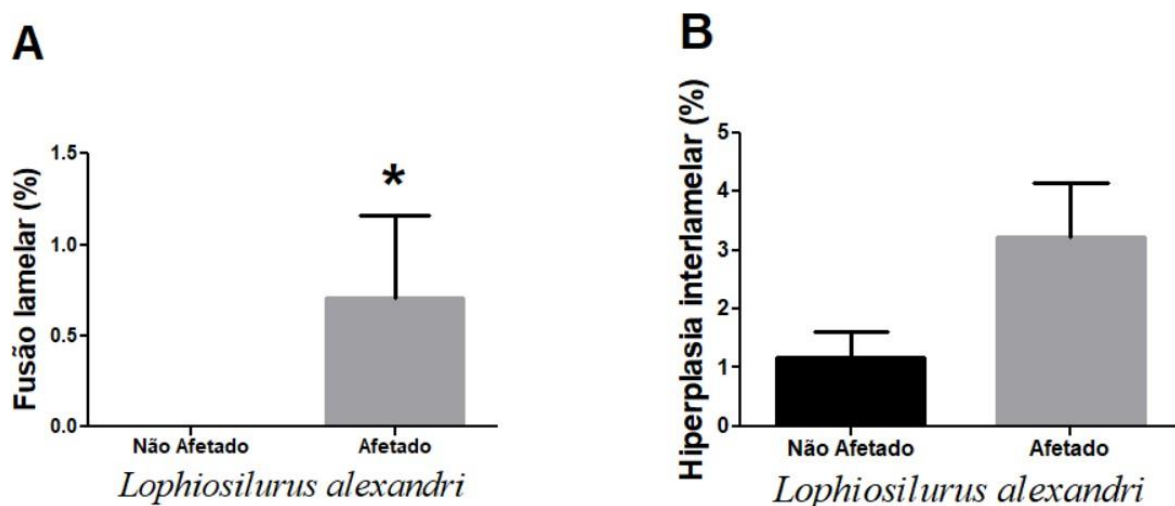
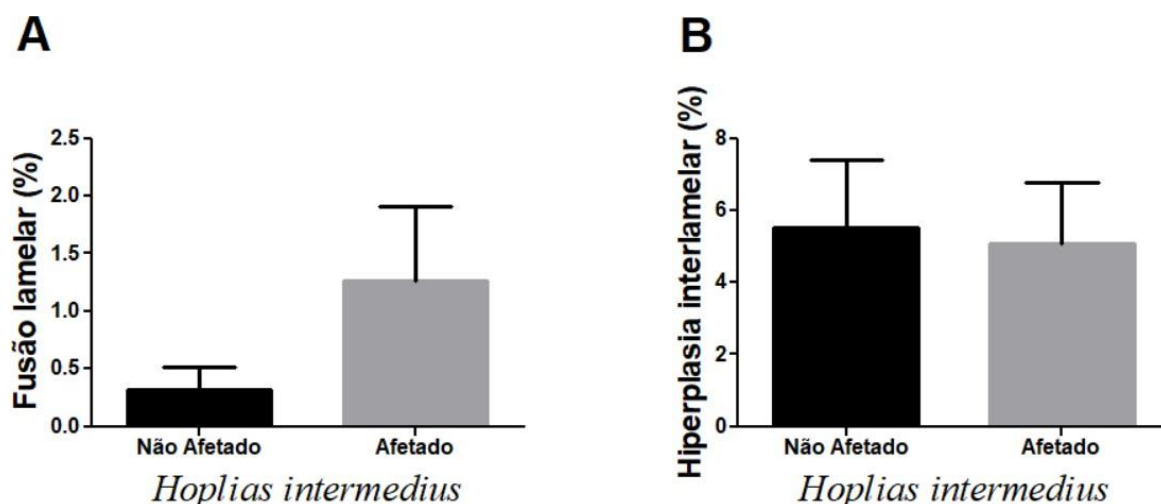


Figura 32. Percentual das principais histopatologias encontradas nas brânquias de espécimes de *Hoplias intermedius* coletados na Bacia do Rio Doce em regiões afetadas e não afetadas pelo rompimento da barragem de rejeitos. (A) Fusão lamelar, (B) Hiperplasia interlamelar. Não houve diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média±EPM.



### 3.3.3. Correlação entre as concentrações de metais e as histopatologias no fígado e nas brânquias

A análise de correlação de Pearson revelou uma associação positiva significativa entre a presença do metal arsênio (As) e a ocorrência de esteatose hepática, além de hiperplasia interlamelar nas brânquias. Observou-se que o ferro (Fe) apresentou uma correlação positiva exclusivamente com a hiperplasia interlamelar nas brânquias, enquanto o zinco (Zn) demonstrou uma correlação positiva com a congestão vascular hepática. Não foram identificadas correlações significativas entre os demais metais e as alterações histopatológicas nos referidos tecidos nas espécies estudadas (Tabela 4).

Tabela 4: Valores da correlação de Pearson para cada metal e os marcadores histopatológicos hepáticos e branquiais das cinco espécies coletadas na Bacia do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de rejeitos.

Metais	Fígado		Brânquias	
	Esteatose	Congestão Vascular	Hiperplasia Interlamelar	Fusão Lamelar
Ag	0.209	-0.320	0.088	-0.167
Al	0.421	0.234	0.594	0.424
As	0.756	0.121	0.700	0.547
Cd	-0.274	-0.329	-0.282	-0.163
Cr	0.128	-0.092	0.223	0.019
Cu	-0.093	0.466	0.269	0.242
Fe	0.435	0.299	0.662	0.472
Hg	0.508	0.204	0.219	0.334
Mn	0.189	0.111	0.296	0.185
Ni	0.118	-0.113	0.235	0.177
Pb	-0.079	-0.180	-0.081	-0.213
Zn	-0.112	0.681	0.158	0.235

## 4. DISCUSSÃO

A reestruturação das populações de espécies de peixes em ecossistemas impactados, como os locais da Bacia do Rio Doce afetados pelo rompimento da barragem de Fundão, representa um desafio crucial para a compreensão dos efeitos a longo prazo desse evento catastrófico. A adaptação das comunidades aquáticas ao novo ambiente pós-rompimento é um processo complexo, envolvendo fatores como alterações nas condições hidrográficas, disponibilidade de recursos alimentares e mudanças nas interações ecológicas (SOINSKI, 2021). Além disso, a presença persistente de metais na água, provenientes dos rejeitos liberados, acrescenta uma dimensão adicional às pressões ambientais enfrentadas pelos organismos aquáticos (MAHBOOB et al., 2019). Este cenário levanta questionamentos sobre a capacidade das espécies sobreviventes de desenvolverem mecanismos celulares de sobrevivência e conseqüentemente mecanismos fisiológicos de adaptação em ambientes extremos. Nesse contexto, o presente estudo avaliou cinco espécies de peixes presentes na Bacia do Rio Doce, analisando especialmente os efeitos adversos desses metais nos tecidos, bem como os impactos dessa exposição prolongada na saúde de organismos aquáticos.

No âmbito de nossa pesquisa, constatamos que o ambiente impactado pelo rompimento da barragem pode oferecer um risco eminente às espécies expostas aos rejeitos, em especial devido ao acúmulo de metais nos tecidos, tendo como resposta direta um desbalanço no equilíbrio oxidativo das células. As conseqüências morfológicas deste desbalanço foram demonstradas pela presença de patologias citoplasmáticas (degenerações celulares), alterações vasculares e distúrbios no crescimento e proliferação celulares. Estas alterações celulares e teciduais possivelmente estão atreladas a alterações no metabolismo e na função das células, dos tecidos e do organismo como um todo. Por isto, acreditamos que estudos futuros com foco na fisiologia dos organismos sejam necessários para entendermos os reais impactos desta tragédia ambiental nos ecossistemas aquáticos e na manutenção das espécies atingidas.

Para realizar uma investigação abrangente e precisa dos impactos causados pelo rompimento da barragem de Fundão, selecionamos 12 metais devido à sua relevância ambiental e aos potenciais efeitos nocivos que podem ter sobre os ecossistemas aquáticos. São eles: prata (Ag), alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn), metais frequentemente associados a atividades industriais e processos de mineração. Dessa forma, o rompimento da barragem de Fundão, que resultou na liberação de rejeitos minerais no leito do Rio Doce, possivelmente introduziu esses metais e/ou aumentou a concentração dos mesmos no ambiente aquático. Portanto, assim como Ferreira et al. (2020), optamos por avaliar o bioacúmulo desses metais no tecido muscular de espécies coletadas em áreas afetadas pelos rejeitos, bem como em áreas não afetadas, para estabelecer comparações significativas.

O arsênio foi o metal que apresentou maior bioacúmulo nos tecidos musculares dos animais encontrados nas áreas afetadas. O arsênio é reconhecido como altamente tóxico para a maioria dos sistemas biológicos. Seu processo de biotransformação implica na conversão de suas formas inorgânicas em compostos orgânicos metilados. O arsênio inorgânico, composto por arsenito (As(III)) e arsenato (As(V)), pode ser metilado para formar ácido monometilarsônico (MMA) ou ácido dimetilarsínico (DMA). Esta conversão envolve uma redução de dois elétrons do arsênio pentavalente, mediada pelo glutatona (GSH), seguida por uma metilação oxidativa que resulta em arsênico orgânico pentavalente (JOMOVA et al., 2011). Suas

formas trivalentes, são consideradas as mais tóxicas, pois apresentam uma afinidade nociva com grupos tióis presentes em proteínas. O arsenito trivalente, por exemplo, inibe diversas enzimas celulares, como a piruvato desidrogenase, reduzindo a conversão de piruvato em acetil coenzima A (CoA), através da ligação a grupos sulfidríla (WANG & ROSSMAN, 1996; GONTIJO & BITTENCOURT, 2005). Embora a metilação do arsênio fosse considerada como um processo de detoxificação, pesquisas recentes apontam que células humanas são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do MMA III em comparação com o arsenito. Além disso, o DMA III exibe toxicidade equiparável ou até maior que o arsenito em diversas linhagens celulares humanas (PETRICK et al., 2000; STYBLO et al., 2000). Assim, a metilação do arsênio pode não garantir uma detoxificação completa. Ademais, mesmo as formas pentavalentes, menos tóxicas, podem causar desacoplamento da fosforilação oxidativa. O arsênio pentavalente se assemelha ao fosfato inorgânico e pode substituí-lo nas vias glicolíticas e de respiração celular. Este fenômeno leva ao desacoplamento da fosforilação oxidativa devido à preferência pela formação de ADP-arsenato, resultando na perda das ligações de fosfato de ATP de alta energia (JOMOVA et al., 2011). Adicionalmente, o arsênio atua na produção de peróxido de hidrogênio e outros radicais reativos, incluindo o radical superóxido, oxigênio singlete, radical peroxila, óxido nítrico, radicais peroxila de dimetilarsínico e o radical dimetilarsínico, fatos que o colocam como elemento com alto potencial gerador de estresse oxidativo (YAMANAKA & OKADA, 1994).

Outros metais, a exemplo de ferro, cobre e níquel, identificados na presente pesquisa, desempenham funções essenciais, em concentrações reduzidas, em vários processos biológicos. Contudo, a acumulação excessiva desses elementos pode resultar em toxicidade, conforme destacado por estudos anteriores (JINADASSA et al., 2021; BORDIGNON, 2003).

Quando presente em excesso dentro das células e tecidos, o ferro desequilibra a estabilidade redox, desencadeando o estresse oxidativo através de diversos mecanismos intracelulares. Um desses mecanismos centrais é a reação de Fenton, na qual o ferro reage com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para gerar o radical hidroxila ( $^*OH$ ), um radical livre altamente reativo. Além disso, em certas condições, o ferro pode ser reduzido a íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ), que são capazes de reagir com o oxigênio molecular ( $O_2$ ) gerando o radical livre superóxido, que, ao interagir com o ferro, resulta na formação de peróxido de hidrogênio em um processo conhecido como reação de Haber-Weiss, amplificando ainda mais o potencial de danos celulares (GALARIS et al., 2019). Da mesma forma, o cobre desempenha um papel significativo na indução do estresse oxidativo através de diferentes mecanismos intracelulares. Em particular, suas formas oxidada (Cu(II)) e reduzida (Cu(I)) podem catalisar a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. Na presença de superóxido ( $O_2^{*-}$ ) ou agentes redutores biológicos como ácido ascórbico ou glutathiona (GSH), o cobre pode ser alternado entre seus estados de oxidação, permitindo que atue como catalisador na decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), resultando na geração do radical hidroxila ( $^*OH$ ), altamente reativo. Esta capacidade do cobre em participar de reações redox intracelulares, juntamente com sua habilidade de alternar entre seus estados de oxidação, o torna um mediador chave na produção de radicais livres, contribuindo assim para a instauração do estresse oxidativo. Além disso, a exposição prolongada a níveis elevados de cobre pode provocar a diminuição dos níveis de glutathiona (GSH), um antioxidante celular essencial, comprometendo ainda mais a capacidade das células de neutralizar EROs e proteger contra o estresse oxidativo (GAETKE & CHOW, 2003). Já o níquel (Ni)

possui a capacidade de desencadear a formação de radicais livres de oxigênio de diversas maneiras. Inicialmente, ele pode se unir diretamente a moléculas de oxigênio molecular ( $O_2$ ), formando um complexo Ni(II)- $O_2$  em um processo de duas etapas. Esse complexo posteriormente se decompõe, liberando o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) como produto final. Além disso, o níquel pode interagir com enzimas responsáveis pela reparação do DNA, substituindo o ferro em sua estrutura. Isso resulta na geração de radicais livres de oxigênio, como o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), os quais são altamente reativos e capazes de causar danos celulares significativos. Adicionalmente, o níquel pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ativando vias de sinalização celular, como o fator de transcrição induzido por hipóxia-1 (HIF-1). Isso desencadeia a geração de EROs intracelulares, contribuindo assim para o estresse oxidativo (GENCHI et al., 2020; DAS et al., 2008).

No escopo deste estudo, nós investigamos os impactos dos rejeitos no tecido hepático das espécies em análise. O fígado, um órgão essencial para a detoxificação de xenobióticos, desempenha um papel crucial nos estudos relacionados à saúde e à capacidade de adaptação dos animais diante dos desafios impostos pela poluição (JAVED & USMANI, 2019). Entre as espécies analisadas, *Hypostomus affinis*, *Oligosarcus acutirostris* e *Lophiosilurus alexandri* demonstraram uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo em seus tecidos hepáticos. Neste contexto, o radical óxido nítrico (NO) mostrou-se elevado, especialmente em *Lophiosilurus alexandri* e *Loricariichthys castaneus*. É importante notar que um aumento isolado no óxido nítrico (NO) não é uma indicação direta de estresse oxidativo, uma vez que o NO desempenha múltiplas funções vitais no organismo, como a regulação do tônus vascular e a sinalização celular. Assim, para determinação precisa do estresse oxidativo, é crucial avaliar não apenas os níveis de NO, mas também outros marcadores de EROs e a capacidade antioxidante do organismo. Neste contexto, *Lophiosilurus alexandri* revelou uma redução nas enzimas antioxidantes, especialmente na superóxido dismutase (SOD), que apresentou uma diminuição significativa no grupo afetado em comparação com o grupo não afetado. Estes resultados sugerem a possibilidade de que os resíduos estejam exercendo um efeito inibitório na síntese desta enzima antioxidante, potencialmente promovendo o desenvolvimento do estresse oxidativo. Vale ressaltar, como já comentado por GONTIJO & BITTENCOURT em 2005, que substâncias como o arsênio têm o potencial de interagir com proteínas, levando à sua inativação, o que pode contribuir para esse cenário de diminuição de enzimas antioxidantes. A espécie *Oligosarcus acutirostris* demonstrou um aumento significativo no marcador malondialdeído (MDA) e na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), quando comparados animais provenientes de áreas não afetadas e afetadas. Esses resultados sugerem um possível início da instauração de um estado de estresse oxidativo celular, evidenciado pelo aumento do MDA, indicador de peroxidação lipídica, e pelo aumento da atividade da SOD, provavelmente associado à resposta celular a esse estresse oxidativo. Por outro lado, na espécie *Hypostomus affinis* observou-se uma leve redução nas enzimas antioxidantes, acompanhada por um aumento expressivo de proteínas carboniladas (PC), quando comparados os grupos provenientes de áreas não afetadas e afetados. Esse aumento de PC indica a oxidação de proteínas, sugerindo um processo mais avançado de estresse nessa espécie, considerando a sequência: lipídios são oxidados primeiro, seguidos por proteínas, e por fim, lesões no DNA, como já descrito por JAKUBCZYK (2020). Estes achados ressaltam a complexidade das respostas bioquímicas a exposições ambientais e sublinha a necessidade de investigações mais aprofundadas para

compreender os mecanismos subjacentes a tais modificações nas defesas antioxidantes em espécies específicas.

Notadamente, em *H. affinis* e *L. alexandri*, foi constatado, nas análises histopatológicas, aumento na incidência de esteatose e congestão vascular hepática. Ambas as espécies exibiram elevados níveis de concentração de arsênio. A análise de correlação utilizando o teste de Pearson revelou uma associação positiva e estatisticamente significativa entre a presença do metal arsênio (As) e a esteatose no tecido hepático. Essas observações destacam a possível relação entre exposição ao arsênio e as alterações histopatológicas no fígado dessas espécies. A instauração do processo de esteatose hepática é um fenômeno multifacetado que resulta de uma interação complexa entre diversos fatores fisiológicos e patológicos. Inicialmente, há um desequilíbrio entre a entrada, síntese, armazenamento e saída de lipídios no fígado, levando a um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos. Esse desequilíbrio pode ser exacerbado pelo estresse oxidativo, que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão da esteatose hepática, influenciando diversos mecanismos que culminam na instauração do acúmulo de gordura no fígado. De acordo com WANG em 2016, esse processo inicia-se com a produção desregulada de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais livres, em detrimento da capacidade antioxidante do fígado. As EROs, ao atacarem os lipídios presentes nos hepatócitos, desencadeiam a peroxidação lipídica, gerando radicais livres de lipídios que comprometem as membranas celulares e organelas. Por exemplo, podem comprometer o funcionamento do retículo endoplasmático e de mitocôndrias, resultando em diminuição da oxidação de ácidos graxos e, conseqüentemente, no maior acúmulo intracelular de lipídios. Ainda, tal dano induz vias inflamatórias e respostas imunes no fígado, ativando macrófagos e promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias. O estresse oxidativo também ativa diversas vias de sinalização celular, como o NF- $\kappa$ B e o Nrf2, que regulam genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e inflamação, contribuindo assim para a instauração da esteatose hepática. Em conjunto, esses mecanismos demonstram a relação complexa entre o estresse oxidativo e a patogênese da esteatose hepática. A congestão vascular, por sua vez, pode ser conseqüência da exposição crônica a agentes nocivos (BROWN-PETERSON et al., 2017), o que pode ocasionar a dilatação dos sinusoides hepáticos. Este estado é caracterizado pelo aumento dos capilares no fígado, frequentemente associado à obstrução do fluxo venoso hepático, resultando em estase vascular e congestão do parênquima hepático (BRANCATELLI et al., 2018). De maneira análoga, a pesquisa conduzida por BEEGAM et al. (2019), ao explorar os potenciais efeitos tóxicos da exposição ao óxido de zinco (ZnO), e ao avaliar as alterações histopatológicas em *Sparus aurata*, identificou um aumento significativo na vacuolização lipídica (esteatose), acompanhado de um aumento expressivo na congestão sanguínea nos sinusoides e nos vasos hepatoporiais. Essas descobertas destacam a sensibilidade do fígado a determinadas substâncias tóxicas, como o arsênio, conforme evidenciado nos estudos de PETRICK et al. e STYBLO et al., ambos realizados em 2000. Essas pesquisas indicam que o processo de desintoxicação de algumas substâncias pode resultar na formação de compostos ainda mais prejudiciais para o organismo. Um exemplo disso é a metilação do arsenito, que gera ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA). Ambos os compostos demonstraram uma citotoxicidade aumentada em comparação com o arsenito, conforme descrito em suas respectivas investigações.

Em organismos aquáticos, o glicogênio desempenha uma função essencial como reserva energética, encontrando-se abundantemente armazenado nos tecidos

hepáticos e musculares dos peixes (BRAGATO et al., 2020). A sua presença em níveis moderados constitui um indicativo de um estado saudável nesses organismos. No entanto, observa-se que metais pesados, de modo geral, desencadeiam uma redução nos níveis de glicogênio hepático. Este fenômeno pode ser atribuído ao estresse físico e oxidativo resultante da contaminação, que demanda elevados aportes energéticos para ativação de mecanismos de defesa do organismo (TEWARI et al., 2019). A regulação da quantidade de glicogênio armazenado é meticulosamente controlada por vias endócrinas, as quais modulam os níveis de glicose no sangue. Em situações de hiperglicemia, ocorre uma resposta hormonal que estimula a ativação de enzimas envolvidas na síntese de glicogênio (ENES et al., 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007). No âmbito deste estudo, não foram identificadas disparidades significativas nos níveis de glicogênio entre os peixes provenientes de áreas impactadas e não impactadas. Esses resultados sugerem que, pelo menos no que diz respeito ao armazenamento de glicogênio, os peixes nas áreas afetadas mantiveram uma homeostase comparável àquela observada em ambientes não afetados.

Para obtermos uma compreensão mais precisa da extensão das lesões hepáticas, optamos por avaliar também a fibrose hepática. Este processo patológico envolve uma série de lesões agudas e crônicas no fígado, desencadeando a ativação de fibroblastos. Essas células desempenham papel fundamental na substituição do tecido lesado por tecido cicatricial, composto principalmente por colágeno do tipo I, o qual não possui a mesma funcionalidade do tecido hepático. Esse processo pode acarretar um desequilíbrio na síntese, degradação e deposição da matriz extracelular no fígado (KHANAM et al., 2021). Em peixes, a fibrose hepática está frequentemente associada a condições de má qualidade da água, ambientes estressantes e presença de agentes patogênicos (CAO et al., 2023). No que diz respeito a essa análise, apenas a espécie *L. alexandri* demonstrou um aumento significativo na densidade volumétrica de colágeno encontrado no tecido hepático, indicando um processo fibrótico avançado em comparação com o grupo de áreas não afetadas. Isso sugere que essa espécie pode ser mais sensível a danos hepáticos. De maneira semelhante, SANTOS et al. (2022) empregaram a fibrose hepática como um parâmetro para avaliar diferentes contaminantes e as variações sazonais (verão e inverno), bem como suas implicações na histologia do fígado de *Luciobarbus bocagei* e *Pseudochondrostoma duriense*. Assim, os resultados de SANTOS et al. (2022) revelaram que os níveis de metais pesados na água do rio Vilarica alcançaram concentrações capazes de causar danos hepáticos significativos aos peixes da região. Tanto a espécie *L. bocagei* quanto *P. duriense* foram afetadas, exibindo lesões no parênquima hepático, nos vasos sanguíneos e nos ductos biliares. As análises histopatológicas do fígado desses peixes revelaram uma série de alterações, incluindo vacuolização dos hepatócitos, ruptura endotelial, necrose e fibrose, com a última sendo mais evidente durante os meses de verão. Além disso, o arsênio foi identificado como um dos metais causadores dessas patologias. Destacando a relevância dessa abordagem na investigação dos efeitos ambientais sobre a saúde hepática em peixes.

Conforme previsto, as brânquias surgiram como o tecido mais vulnerável entre as espécies examinadas. Em organismos aquáticos, as brânquias desempenham um papel crucial na avaliação dos efeitos dos poluentes ambientais, devido à sua extensa superfície de contato com o meio externo (DE MARCO et al., 2023; ALE et al., 2018). Este órgão desempenha funções vitais, incluindo respiração, ionorregulação, regulação ácido-base e excreção de resíduos nitrogenados, tornando-se assim diretamente exposto à água e, conseqüentemente, aos agentes poluentes (CAPPELLO et al., 2018). A exposição a metais pesados pode induzir estresse

oxidativo nas brânquias, comprometendo processos fisiológicos essenciais e levando à mortalidade do organismo (LI et al., 2021; SCHLENK & BENSON, 2017). No geral, em relação aos indicadores de estresse oxidativo, foi notado um aumento significativo em alguns marcadores de dano oxidativo tecidual (MDA, PC e NO) nas espécies de peixes coletadas em áreas afetadas, o que sugere um estado de estresse oxidativo nesse tecido, indicado por danos tanto a lipídios quanto a proteínas.

As espécies objeto deste estudo que apresentaram maior impacto no tecido branquial incluem *L. castaneus*, *L. alexandri*, *H. affinis* e *H. intermedius*. Notadamente, *L. castaneus* se destacou ao exibir níveis elevados de dois marcadores de estresse oxidativo (MDA e PC), assim como de duas enzimas antioxidantes (SOD e GST). Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de uma produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que podem induzir à oxidação de lipídios e proteínas. Neste contexto, o sistema antioxidante desempenha um papel proeminente, com a expressão elevada de enzimas como a SOD (Superóxido Dismutase), atuando como a primeira linha de defesa, e GST (Glutathione S-Transferase), como a segunda linha de defesa, visando neutralizar as EROs e mitigar os danos celulares associados. A SOD é uma enzima antioxidante crucial na primeira linha de defesa contra os radicais livres, especialmente o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ). Ao acelerar a passagem de um elétron para o superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), a SOD neutraliza eficazmente o superóxido altamente reativo, protegendo as células contra danos oxidativos. Por sua vez, a GST desempenha um papel vital na detoxificação celular, conjugando moléculas tóxicas com a glutathione (GSH), formando conjugados menos reativos e mais solúveis em água. Além disso, a GST atua como uma peça-chave na proteção antioxidante, neutralizando radicais livres e peróxidos, e preservando lipídios, proteínas e ácidos nucleicos contra danos oxidativos. Esta enzima também contribui para a regeneração da GSH, essencial para manter os níveis adequados de glutathione no citoplasma, garantindo assim a eficácia contínua da defesa antioxidante celular. Dentre as espécies estudadas, embora *O. acutirostris* tenha apresentado níveis elevados de cobre nos músculos, foi a única que não demonstrou alterações significativas no perfil oxidativo. Esses resultados indicam a variabilidade nas respostas fisiológicas das espécies diante das condições ambientais adversas, ressaltando a importância de considerar tais nuances ao avaliar os impactos sobre a saúde dos organismos.

Além disso, a espécie *L. castaneus* destacou-se como a única a apresentar um aumento significativo de hiperplasia interlamelar nas brânquias, sugerindo que tal fenômeno pode ser atribuído ao estresse oxidativo. A hiperplasia interlamelar branquial é uma modificação histopatológica observada em peixes expostos a condições ambientais desfavoráveis, como baixa concentração de oxigênio, temperaturas elevadas ou contaminação por agentes tóxicos. Esse processo patológico envolve o aumento do número de células epiteliais entre as lamelas secundárias, estruturas responsáveis pelas trocas gasosas nas brânquias. A hiperplasia interlamelar resulta na redução do espaço entre as lamelas, dificultando a difusão eficiente de oxigênio e dióxido de carbono, comprometendo assim a função respiratória dos peixes (REIS et al., 2009). Paralelamente, no que concerne à concentração de metais no músculo, observou-se um aumento notável do arsênio e níquel nos indivíduos de *L. castaneus* de locais afetados em relação aos de locais não afetados. De acordo com RODRIGUES & SMITH (2022) tal fenômeno pode ser atribuído aos hábitos alimentares iliófagos da espécie, que a colocam em contato direto com o sedimento, possibilitando a interação eventual com contaminantes presentes no meio aquático, precipitados e biodisponibilizados no fundo do leito do

rio. Conforme evidenciado no trabalho de RODRIGUES & SMITH (2022), no qual foram analisadas as concentrações de metais nos tecidos de algumas espécies de peixes utilizadas como bioindicadores, pertencentes a diferentes níveis tróficos, e os resultados apontaram para uma maior contaminação no grupo trófico iliófago.

Quanto às análises das brânquias, notou-se que as espécies *L. castaneus*, *L. alexandri*, *H. affinis* e *O. acutirostris* apresentaram fusão lamelar, resultando na aderência entre as lamelas branquiais. Essa fusão pode ser uma decorrência do avanço da hiperplasia interlamelar, promovendo a união das lamelas secundárias. Esse fenômeno compromete o funcionamento adequado do órgão e, por conseguinte, a capacidade respiratória dos animais, conforme evidenciado por CASTRO et al. (2018). Essa observação ressalta a importância de compreender os efeitos adversos desencadeados por tais alterações nas brânquias dessas espécies, impactando diretamente na sua fisiologia respiratória.

No presente estudo, podemos dizer que *L. alexandri* e *H. affinis* foram as espécies com o fígado mais afetado, levando-se em conta as análises de estresse oxidativo e histopatologias. E no que diz respeito às brânquias, podemos acrescentar, além dessas duas supracitadas, a espécie *L. castaneus*. Espécies essas que também apresentaram níveis significativos de arsênio nos músculos, e tem como características comuns o fato de serem peixes de couro (Siluriformes) e habitarem o fundo dos rios (bentônicos), estando mais expostos aos metais acumulados nos sedimentos. Estudos adicionais com espécies de peixes na região de Mariana - MG, subsequente ao desastre do rompimento da barragem, sustentam e corroboram os resultados obtidos em nossa pesquisa. WEBER et al. (2020) relataram que *Hoplias intermedius* e *Hypostomus affinis* exibiram alterações histopatológicas e indução de estresse oxidativo hepático no local contaminado. Adicionalmente, constatou-se o bioacúmulo de metais como arsênio, cromo, manganês, mercúrio, selênio e zinco nos músculos e fígado de algumas espécies de peixes presentes na área afetada, conforme evidenciado por GABRIEL et al. (2020), FERREIRA et al. (2020) e VIEIRA et al. (2022). Além disso, altos níveis de metais foram detectados tanto na água quanto no sedimento das regiões impactadas, como apontado por AGUIAR et al. (2020) e GABRIEL et al. (2020). Essa convergência de resultados entre diferentes estudos reforça a consistência das implicações ambientais e biológicas decorrentes do desastre ambiental, sublinhando a necessidade e relevância de estratégias efetivas de mitigação e reabilitação nessas áreas afetadas.

As espécies *Hypostomus affinis* e *Lophiosilurus alexandri* emergiram como as mais impactadas no geral, apresentando estresse oxidativo e lesões histopatológicas em ambos os tecidos, branquial e hepático. *Hypostomus affinis* destacou-se por ser a única espécie a evidenciar um aumento nos marcadores bioquímicos de danos teciduais, especificamente as proteínas carboniladas, em ambos os tecidos avaliados (brânquias e fígado). Essa constatação foi corroborada por estudos histopatológicos que validaram esses resultados, tendo essa espécie apresentado fusão lamelar e esteatose hepática. Além disso, a espécie apresentou elevados níveis de arsênio nos músculos. Por sua vez, *L. alexandri*, que apresentou consideráveis quantidades de arsênio e ferro, revelou-se impactada, exibindo níveis elevados de malondialdeído (MDA) nas brânquias, indicando peroxidação lipídica. Achados patológicos, como fusão lamelar nas brânquias, somaram-se a essa observação. No fígado, esta espécie foi considerada a mais sensível, evidenciando uma incidência elevada de esteatose, congestão vascular hepática e um significativo processo fibrótico. Dada a abundância dessas espécies em toda a bacia e sua sensibilidade às variáveis testadas, sugere-se que o cascudo-manteiga *H. affinis* e o pacamã *L. alexandri* possam ser indicadores

biológicos promissores para avaliações de alterações ambientais, proporcionando informações cruciais para a conservação e gestão dos ecossistemas aquáticos.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelam-se potencialmente valiosos como indicadores biológicos abrangentes das alterações ambientais decorrentes do rompimento da barragem na região de Mariana - MG. Essas descobertas oferecem uma abordagem essencial para o biomonitoramento do ecossistema impactado, fornecendo informações significativas sobre os efeitos dessas mudanças nas espécies estudadas. Observou-se, em particular, que animais provenientes de áreas afetadas apresentaram marcantes alterações histopatológicas e danos oxidativos, especialmente no tecido branquial, um componente vital para processos fisiológicos essenciais nos peixes. Ao analisar coletivamente todas as espécies, destaca-se o arsênio (As) como o metal com concentração significativamente aumentada em peixes oriundos de locais impactados pelo rejeito. Além disso, níquel (Ni), ferro (Fe) e cobre (Cu) também foram identificados em quantidades elevadas em determinadas espécies. Os demais metais apresentaram uma distribuição comparável entre os dois ambientes estudados. Em conjunto, esses resultados contribuem para um entendimento abrangente do perfil oxidativo e da concentração de metais nas populações de peixes da região após o incidente da barragem de minério. Tais conclusões são cruciais para a avaliação do impacto ambiental decorrente desse evento, facilitando a formulação de estratégias eficazes de conservação e recuperação do ecossistema aquático. A utilização dessas informações como base para a implementação de medidas mitigadoras pode ser instrumental para minimizar os impactos a longo prazo dessa perturbação ambiental.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALAKA SE, Enem SI, Idoko IS, Sani NA, Tenuche OZ, Ejeh SA, Sambo WK. Heavy Metals Bioaccumulation and Health Risks with Associated Histopathological Changes in *Clarias gariepinus* from the Kado Fish Market, Abuja, Nigeria. *J Health Pollut.* 2020 May 4;10(26):200602. doi: 10.5696/2156-9614-10.26.200602. PMID: 32509403; PMCID: PMC7269322.
- AEBI, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, p. 121-126.
- AGBUGUI, M. O., Abe, G. O. Heavy metals in fish: bioaccumulation and health. *British Journal of Earth Sciences Research* 10(1): 47-66, 2022. <https://doi.org/10.37745/bjesr.2013>

- AGUIAR, Valquiria & Neto, José & Quaresma, Valéria & Bastos, Alex & Athayde, João. (2020). Bioavailability and ecological risks of trace metals in bottom sediments from Doce river continental shelf before and after the biggest environmental disaster in Brazil: The collapse of the Fundão dam. *Journal of Environmental Management*. 272. 111086. 10.1016/j.jenvman.2020.111086.
- AGUILERA-MÉNDEZ A. Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente [Nonalcoholic hepatic steatosis: a silent disease]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2019 Mar 15;56(6):544-549. Spanish. PMID: 30889343.
- ALE, A., Bacchetta, C., Rossi, A. S., Galdopórpora, J., Desimone, M. F., Fernando, R. D. L. T., ... & Cazenave, J. (2018). Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 976-984.
- ARDESHIR, R. A., Movahedinia, A. A., & Rastgar, S. (2017). Fish liver biomarkers for heavy metal pollution: a review article. *American Journal of Toxicology*, 2(1), 1-8.
- BALALI-MOOD M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 13;12:643972. doi: 10.3389/fphar.2021.643972. PMID: 33927623; PMCID: PMC8078867.
- BALLOTIN, L V et al. "Bioaccumulation of Heavy Metals in Two Species of Fish in the Rio Doce Basin after the Rupture of the Ore Tailings Dam in Mariana City, Minas Gerais, Brazil." *International Journal of Zoology and Animal Biology*, vol. 6, no. 6, 1 Jan. 2023, pp. 1–2, <https://doi.org/10.23880/izab-16000535>. Accessed 11 July 2024.
- BEEGAM A, Lopes M, Fernandes T, Jose J, Barreto A, Oliveira M, Soares AMVM, Trindade T, Thomas S, Pereira ML. Multiorgan histopathological changes in the juvenile seabream *Sparus aurata* as a biomarker for zinc oxide particles toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020 Sep;27(25):30907-30917. doi: 10.1007/s11356-019-05949-7. Epub 2019 Aug 3. PMID: 31376128.

- BORDIGNON, Clara Venilda Melchior. Os minerais do corpo: uma visão interdisciplinar. *Arquivos do Mudi*, v. 7, n. 2, p. 61-63, 2003.
- BOTELHO, M. R., Faria, M. P. D., Mayr, C. T. R., & Oliveira, L. M. G. D. (2021). Rompimento das barragens de Fundão e da Mina do Córrego do Feijão em Minas Gerais, Brasil: decisões organizacionais não tomadas e lições não aprendidas. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 46.
- BOTTINO, F., Milan, J.A.M., Cunha-Santino, M.B., Bianchini, I., 2017. Influence of the residue from an iron mining dam in the growth of two macrophyte species. *Chemosphere* 186, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.030>.
- BRAGATO C, Carra S, Blasevich F, Salerno F, Brix A, Bassi A, Beltrame M, Cotelli F, Maggi L, Mantegazza R, Mora M. Glycogen storage in a zebrafish Pompe disease model is reduced by 3-BrPA treatment. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 May 1;1866(5):165662. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165662. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31917327.
- BRANCATELLI G, Furlan A, Calandra A, Dioguardi Burgio M. Hepatic sinusoidal dilatation. *Abdom Radiol (NY)*. 2018 Aug;43(8):2011-2022. doi: 10.1007/s00261-018-1465-8. PMID: 29392360.
- BROWN-PETERSON NJ, Krasnec MO, Lay CR, Morris JM, Griffitt RJ. Responses of juvenile southern flounder exposed to Deepwater Horizon oil-contaminated sediments. *Environ Toxicol Chem*. 2017 Apr;36(4):1067-1076. doi: 10.1002/etc.3629. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27676139.
- BUEGE, J. A., & Aust, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*. Academic press (52): 302-310, 1978.
- CAMARGO, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol*. 94, 40–46.
- CAO Q, Shan H, Zhao J, Deng J, Xu M, Kang H, Li T, Zhao Y, Liu H, Jiang J. Liver fibrosis in fish research: From an immunological perspective. *Fish Shellfish Immunol*. 2023 Aug;139:108885. doi: 10.1016/j.fsi.2023.108885. Epub 2023 Jun 6. PMID: 37290612.

- CAPPELLO T, Giannetto A, Parrino V, Maisano M, Oliva S, De Marco G, Guerriero G, Mauceri A, Fasulo S. Baseline levels of metabolites in different tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2018 Jun;26:32-39. doi: 10.1016/j.cbd.2018.03.005. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29605489.
- CASTRO, J. S. et al. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, v. 70, n. 2, p. 410–418, 1 mar. 2018.
- CORDEIRO MC, Garcia GD, Rocha AM, Tschoeke DA, Campeão ME, Appolinario LR, Soares AC, Leomil L, Froes A, Bahiense L, Rezende CE, de Almeida MG, Rangel TP, De Oliveira BCV, de Almeida DQR, Thompson MC, Thompson CC, Thompson FL. Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. *Sci Total Environ*. 2019 Mar 1;654:1209-1217. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.112. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30841395.
- Das, Kusal & Das, Swastika & Dhundasi, S.A.. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *The Indian journal of medical research*. 128. 412-25.
- DE MARCO G, Eliso MC, Oliveri Conti G, Galati M, Billè B, Maisano M, Ferrante M, Cappello T. Short-term exposure to polystyrene microplastics hampers the cellular function of gills in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 2023 Nov;264:106736. doi: 10.1016/j.aquatox.2023.106736. Epub 2023 Oct 28. PMID: 37913686.
- DIETERICH, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101(1), 33-39.
- LOWRY, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.

- DORIA HB, Voigt CL, Sandrini-Neto L, Campos SX, de Oliveira-Ribeiro CA, Randi MAF. How and where to perform biomonitoring studies: different levels of toxic metal pollution are detected in the Alagados Reservoir in Southern Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017 May;24(14):13080-13094. doi: 10.1007/s11356-017-8953-1. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28382448.
- EL-BOSHY ME, Risha EF, Abdelhamid FM, Mubarak MS, Hadda TB. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2015 Jan;29:104-10. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.05.009. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24954678.
- ENES, P. et al. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 3, p. 519–539, 14 set. 2008.
- ERCAL, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 529-539
- FERREIRA, F. F., de Freitas, M. B. D., Szinwelski, N., Vicente, N., Medeiros, L. C. C., Schaefer, C. E. G. R., ... & Sperber, C. F. (2020). Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5), 622-630.
- FORMAN HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Sep;20(9):689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1. Epub 2021 Jun 30. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Aug;20(8):652. PMID: 34194012; PMCID: PMC8243062.
- FU, Z.; SHI, X. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 30, n. 3, p. 167–176, 17 dez. 2019.
- GABRIEL FÂ, Hauser-Davis RA, Soares L, Mazzuco ACA, Rocha RCC, Saint Pierre TD, Saggiro E, Correia FV, Ferreira TO, Bernardino AF. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a

- mine tailing disaster. *PeerJ*. 2020 Oct 28;8:e10266. doi: 10.7717/peerj.10266. PMID: 33194429; PMCID: PMC7602685.
- GAETKE LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2003 Jul 15;189(1-2):147-63. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00159-8. PMID: 12821289.
- GALARIS D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019 Dec;1866(12):118535. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118535. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31446062.
- GALL, J.E., Boyd, R.S., Rajakaruna, N., 2015. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environ. Monit. Assess.* 187, 201–222. [https://doi.org/ 10.1007/s10661-015-4436-3](https://doi.org/10.1007/s10661-015-4436-3).
- GENCHI G, Carocci A, Lauria G, Sinicropi MS, Catalano A. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 21;17(3):679. doi: 10.3390/ijerph17030679. PMID: 31973020; PMCID: PMC7037090.
- GOMES ID, Nascimento AA, Sales A, Araújo FG. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in freshwater neotropical systems? *Environ Monit Assess*. 2012 Sep;184(9):5523-31. doi: 10.1007/s10661-011-2358-2. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21956340.
- GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. V. Arsênio: uma revisão histórica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n. 1, p. 91–95, 1 fev. 2005.
- HABIG, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*. 2020 Apr 22;48(284):124-127. PMID: 32352946.

- JAVED, M., Usmani, N. An Overview of the Adverse Effects of Heavy Metal Contamination on Fish Health. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 89, 389–403 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0875-7>
- JINADASA, B.K.K.K., Chaturika, G.S., Jayaweera, C.D., Jayasinghe, G.D.T.M., 2018. Mercury and cadmium in swordfish and yellowfin tuna and health risk assessment for Sri Lankan consumers. *Food Addit. Contam.B* 1–6. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1551247>.
- JINADASA, B. K. K. K., Jayasinghe, G. D. T. M., Pohl, P., & Fowler, S. W. (2021). Mitigating the impact of mercury contaminants in fish and other seafood—A review. *Marine Pollution Bulletin*, 171, 112710.
- JOHN Fox and Sanford Weisberg (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL:<https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- KHANAM A, Saleeb PG, Kottiril S. Pathophysiology and Treatment Options for Hepatic Fibrosis: Can It Be Completely Cured? *Cells*. 2021 May 4;10(5):1097. doi: 10.3390/cells10051097. PMID: 34064375; PMCID: PMC8147843.
- KISSELEVA T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Mar;18(3):151-166. doi: 10.1038/s41575-020-00372-7. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33128017.
- KROON F, Streten C, Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS One*. 2017 Apr 12;12(4):e0174762. doi: 10.1371/journal.pone.0174762. PMID: 28403149; PMCID: PMC5389625.
- LEVINE, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 464-478). Academic Press.
- LIEBEL, S., Tomotake, M.E.M., Oliveira-ribeiro, C.A., 2013. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8, 9 15. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.02.002>

- LI, Zhuoqing & Chang, Xueqing & Hu, Menghong & Fang, James & Huang, Wei & Xu, Elvis Genbo & Wang, Youji. (2021). Is microplastic an oxidative stressor? Evidence from a meta-analysis on bivalves. *Journal of Hazardous Materials*. 10.1016/j.jhazmat.2021.127211.
- MAHBOOB, Shahid & Al-Ghanim, Khalid & Al-Balawi, H.F. & Almisned, Fahad & Ahmad, Zubair. (2019). Toxicological effects of heavy metals on histological alterations in various organs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from freshwater reservoir. *Journal of King Saud University - Science*. 32. 10.1016/j.jksus.2019.07.004.
- ONKAR, S.B., Sulochana, J., 2015. Some aspects of reproductive biology on effect of heavy metal pollution on the histopathological structure of gonads in *Labeo rohita* (Hamilton-Buchanan) from Harike wetland, India. *Int. J. Fish. Aquac.* 7, 9–14.
- PETRICK, J. S. et al. Monomethylarsonous Acid (MMAIII) Is More Toxic Than Arsenite in Chang Human Hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 163, n. 2, p. 203–207, 1 mar. 2000.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, A. et al. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*, v. 265, n. 1-4, p. 325–335, 1 maio 2007.
- RAHMAN, A. N. A., ElHady, M., Hassanin, M. E., Mohamed, A. A. R. Alleviative effects of dietary Indian lotus leaves on heavy metals-induced hepato-renal toxicity, oxidative stress, and histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 509: 198-208, 2019.
- REIS, A. B. et al. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 4, p. 303–311, 1 abr. 2009.
- REIS, M. et al. Panorama dos rompimentos de barragens de rejeito de minério no mundo. *Caderno de Geografia*, v. 30, n. 61, p. 368–368, 5 abr. 2020.

- RENU K, Chakraborty R, Myakala H, Koti R, Famurewa AC, Madhyastha H, Vellingiri B, George A, Valsala Gopalakrishnan A. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity - A review. *Chemosphere*. 2021 May;271:129735. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129735. Epub 2021 Jan 30. PMID: 33736223.
- RODRIGUES, K. F. S.; SMITH, W. S. Assessment of potentially toxic metals in water, sediment, and the tissues of seven important fish species from neotropical brazilian river. *Neotropical Ichthyology*, v. 20, p. e210155, 19 dez. 2022.
- SÁNCHEZ, Luis & Alger, Keith & Alonso, Luiza & Barbosa, Francisco & Wey de Brito, Maria & Laureano, Fernando & May, Peter & Roeser, Hubert & Kakabadse, Yolanda. (2018). Os impactos do rompimento da Barragem de Fundão: o caminho para uma mitigação sustentável e resiliente. 10.2305/IUCN.CH.2018.18.pt.
- SANJEEV S, Bidanchi RM, Murthy MK, Gurusubramanian G, Roy VK. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver and renal oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 Jul;26(20):20631-20653. doi: 10.1007/s11356-019-05420-7. Epub 2019 May 18. PMID: 31104231.
- SANTOS, R. M. B. et al. Seasonal Differences in Water Pollution and Liver Histopathology of Iberian Barbel (*Luciobarbus bocagei*) and Douro Nase (*Pseudochondrostoma duriense*) in an Agricultural Watershed. *Water*, v. 14, n. 3, p. 444–444, 1 fev. 2022.
- SCHLENK, Daniel & Benson, William. (2017). Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: Organs. 10.1201/9781315109244.
- SHMARAKOV IO, Borschovetska VL, Blaner WS. Hepatic Detoxification of Bisphenol A is Retinoid-Dependent. *Toxicol Sci*. 2017 May 1;157(1):141-155. doi: 10.1093/toxsci/kfx022. PMID: 28123100; PMCID: PMC6075223.
- SILVA, A.C., Cavalcante, L.C.D., Fabris, J.D., Júnior, R.F., Barral, U.M., Farnezi, M.M.de M., Viana, A.J.S., Ardisson, J.D., Eugenio, L., Fernandez-Outon, Lara, L.R.S., Stumpf, H.O., Barbosa, J.B.S., Silva, L.C.da, 2016. Chemical,

mineralogical and physical characteristics of a material accumulated on the river margin from mud flowing from the collapse of the iron ore tailings dam in Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Espinhaço* 5, 44–53. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3957942>.

SILVA, Stella Bicalho. Efeitos toxicológicos do herbicida atrazina sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de juvenis *Astyanax altiparanae*. 2021. 37 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2021.

SOINSKI, Thais Aparecida. Restabelecimento da assembleia de peixes em um riacho após rompimento de barragem e processo de restauração ecológica. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2021. doi:10.11606/D.18.2021.tde-16032023-103912. Acesso em: 2024-01-23

SOUZA, Ingrid Alves de. Determinação de arsênio total em peixes tainha (*Mugil* sp.) através da espectrofotometria de absorção molecular. Orientador: George Queiroz de Brito. 2023. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

STYBLO et al. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of toxicology*, v. 74, n. 6, p. 289–299, 18 ago. 2000.

TAIYUN W. and Viliam S., 2021. R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>

TARIQ Z, Green CJ, Hodson L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Liver Int.* 2014 Aug;34(7):e180-90. doi: 10.1111/liv.12523. Epub 2014 Mar 28. PMID: 24621397.

TESCHKE R. Aluminum, Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Cobalt, Copper, Iron, Lead, Mercury, Molybdenum, Nickel, Platinum, Thallium,

- Titanium, Vanadium, and Zinc: Molecular Aspects in Experimental Liver Injury. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 13;23(20):12213. doi: 10.3390/ijms232012213. PMID: 36293069; PMCID: PMC9602583.
- TEWARI, S.; BAJPAI, S.; TRIPATHI, M. Effect of cadmium on glycogen content in muscle, liver, gill and kidney tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Journal of Applied and Natural Science*, v. 11, n. 2, p. 575–580, 11 jun. 2019.
- TSIKAS, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1-2), 51-70.
- VALAVANIDIS A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006 Jun;64(2):178-89. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013. PMID: 16406578.
- VERGÍLIO, S. et al. Immediate and long-term impacts of one of the worst mining tailing dam failure worldwide (Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil). *Science of The Total Environment*, v. 756, p. 143697–143697, 1 fev. 2021.
- VIEIRA, Carlos Eduardo Delfino et al. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. *Science of the Total Environment*, n. 832, 2022 Tradução. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.15487>. Acesso em: 12 jan. 2024
- WANG, K. Molecular mechanism of hepatic steatosis: pathophysiological role of autophagy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 18, 1 jan. 2016.
- WEBER AA, Sales CF, de Souza Faria F, Melo RMC, Bazzoli N, Rizzo E. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020 Mar 1;190:110165. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110165. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31918258.

- WICKHAM, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.
- YACOUB, A. M., Mahmoud, S. A., & Abdel-Satar, A. M. Accumulation of heavy metals in tilapia fish species and related histopathological changes in muscles, gills and liver of *Oreochromis niloticus* occurring in the area of Qahr El-Bahr, Lake Al- Manzalah, Egypt. Oceanological and Hydrobiological Studies 50(1): 1-15, 2021. <https://doi.org/10.2478/oandhs-2021-0001>
- ZULKIPLI, S. Z., Liew, H. J., Ando, M., Lim, L. S., Wang, M., Sung, Y. Y., & Mok, W. J. A review of mercury pathological effects on organs specific of fishes. Environmental Pollutants and Bioavailability 33(1): 76-87, 2021. <https://doi.org/10.1080/26395940.2021.1920468>