

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Respostas ecotoxicológicas do lambari de rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)
expostos ao rejeito de mineração da bacia do Rio Doce**

Carolina Silva Abreu
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

CAROLINA SILVA ABREU

**Respostas ecotoxicológicas do lambari de rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)
expostos ao rejeito de mineração da bacia do Rio Doce**

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

Orientadora: Mariella B. D. de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

A162r
2025 Abreu, Carolina Silva, 1999-
Respostas ecotoxicológicas do lambari de rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) expostos ao rejeito de mineração da bacia do Rio Doce / Carolina Silva Abreu. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2025.

Referências bibliográficas: f. 40-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.423>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Astyanax lacustris*. 2. Toxicologia ambiental. 3. Peixes - Efeito dos metais pesados. 4. Desastres ambientais.
5. Histopatologia. I. Freitas, Mariella Bontempo Duca de, 1974-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. III. Título.

CDD 22. ed. 597.48

CAROLINA SILVA ABREU

**Respostas ecotoxicológicas do lambari de rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)
expostos ao rejeito de mineração da bacia do Rio Doce**

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

APROVADA: 31 de março de 2025.

Assentimento:

Carolina Silva Abreu
Autora

Mariella Bontempo Duca de Freitas
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 25/06/2025 às 14:31:49 e pela orientadora em 25/06/2025 às 14:50:03. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **DFRY.2P6P.TQPC** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e às agências financiadoras citadas acima pelo fomento à pesquisa nacional. Agradeço também a Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) pelo auxílio e gestão eficiente dos recursos empregados.

Agradeço também aos meus professores e mestres da profissão: Mariella Freitas, Jener Zuanon, Jorge Dergam, Ana Lúcia Salaro e Carlos Sperber pelos ensinamentos e puxões de orelha. Agradeço também aos demais professores da Ecologia: Ricardo Campos, Thiago Kloss, Lucas Paolucci e José Schoereder pelas aulas excepcionais. Ao Lucas Marcon pelo auxílio com as análises histológicas. À Ana Luiza Destro, Renata Freitas e Jerusa Oliveira pelo apoio à distância com minhas mensagens e emails de socorro. Aos laboratórios LEQ, LAFAP e LABP que se tornaram minha casa por vários meses. Aos meus amigos e parceiros de bancada, Pedro Neves e Kemilli Gregório pela instrução com equipamentos, protocolos e ensaios, além de auxiliarem na revisão deste texto. E à Emmily Debona pela parceria e pela ajuda com as inúmeras horas de laboratório, inclusive aos sábados e feriados.

E por fim agradeço à minha família que foi a base de tudo. Começando pelos meus avós Telma e Jorge (em memória); Juracy e Gercino (em memória), ter vocês na minha vida foi fundamental em várias formas que eu nem poderia descrever. Aos meus pais Shyrley e Valdir por todo o sacrifício, saudade sentida e pelos ensinamentos ao longo desses vários anos de jornada longe de casa. Ao meu irmão Christian e cunhada Ana Júlia por toda palhaçada e desabafo que tiveram que ouvir. Aos meus tios e tias Barbara, Maxwell, Carla, Rosilene e Aparecida pelo apoio. E por fim, os meus dois amores, meu marido Lucas, por todo o apoio do início ao fim da pesquisa, me acompanhando em cada etapa da jornada e me impedindo de desistir quando eu me sentia incapaz. E ao meu gatinho Frajola por cado aconchego e miado em momentos de estresse. Esse projeto é uma conquista de todos vocês.

RESUMO

ABREU, Carolina Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2025. **Respostas ecotoxicológicas do lambari de rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) expostos ao rejeito de mineração da bacia do Rio Doce.** Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

O rompimento da barragem do Fundão em Mariana (MG) em 2015 liberou milhões de toneladas de rejeitos na Bacia do Rio Doce. Este estudo avaliou os efeitos fisiológicos da exposição crônica a rejeitos em alevinos de lambari (*Astyanax lacustris*) durante 35 dias, em quatro condições de água e substrato: água de torneira-areia (controle - TA), água do rio-areia (RA), água de torneira-rejeito (TR) e água do rio-rejeito (RR). Após o período de exposição, foram analisados a taxa de sobrevivência, crescimento, parâmetros histopatológicos, concentrações hormonais e biomarcadores de estresse oxidativo em brânquias, fígado e testículos. Amostras de água dos tratamentos também foram analisadas para quantificação de metais. Os resultados indicam aumento da mortalidade em ambos os tratamentos com rejeito, diminuição dos parâmetros de crescimento corporal, danos histopatológicos, desbalanço no status oxidativo e aumento das concentrações de cortisol em comparação ao grupo controle. Esses achados indicam que a exposição crônica ao rejeito causa danos fisiológicos, sendo mais significativos nas brânquias e fígado. Tais danos comprometem a saúde dos animais, e conseqüentemente a sobrevivência dos mesmos, o que pode causar a instabilidade da população. Além disso, a água do Rio Doce isoladamente apresenta sinais de contaminação antropogênica histórica. Por fim, destaca-se também a redução da biodisponibilidade de fósforo nos tratamentos com rejeito, possivelmente associada a limitações metabólicas e ao crescimento comprometido.

Palavras-chave: ecotoxicologia; histopatologia; desastre ambiental; metais pesados

ABSTRACT

ABREU, Carolina Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2025. **Ecotoxicological responses of yellow-tailed lambari (*Astyanax lacustris*) exposed to tailings from the Rio Doce basin.** Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

The Fundão dam collapse in Mariana (MG) in 2015 released millions of tons of tailings into the Rio Doce Basin. This study evaluated the physiological effects of chronic exposure to tailings on lambari (*Astyanax lacustris*) fingerlings for 35 days, under four water and substrate conditions: tap water-sand (control - TA), river water-sand (RA), tap water-tailings (TR) and river water-tailings (RR). After the exposure period, survival rate, growth, histopathological parameters, hormone concentrations and biomarkers of oxidative stress in gills, liver and testes were analyzed. Water samples from the treatments were also analyzed for metal content. The results indicate increased mortality in both treatments with tailings, decreased body growth parameters, histopathological damage, oxidative imbalance, and increased cortisol concentrations compared to the control group. These findings suggest that chronic exposure to tailings causes physiological damage, which is most pronounced in the gills and liver. Such damage compromises the health and survival of the animals, potentially causing instability in the population. Additionally, the water of the Rio Doce alone shows signs of historical anthropogenic contamination. Finally, the reduction in phosphorus bioavailability in the treatments with tailings is noteworthy, possibly associated with metabolic limitations and impaired growth.

Keywords: ecotoxicology; histopathology; environmental disaster; heavy metals.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURA 1: Local de coleta da água do rio e da lama de rejeito.....	11
FIGURA 2. Lambari-do-rabo-amarelo.....	13
FIGURA 3: Mortalidade por tratamento.....	17
FIGURA 4. Sobrevivência (%) de peixes ao longo do tempo de exposição.....	18
FIGURA 5. Efeitos da interação água-substrato no peso (g) e comprimento (mm) dos animais.....	19
FIGURA 6. Peso (g) e comprimento (mm) dos animais distribuídos nos quatro tratamentos.....	20
Tabela 1. Classificação das alterações histopatológicas nas brânquias.....	21
FIGURA 7. Fotomicrografias representativas de brânquias sob diferentes tratamentos.....	21
Tabela 2. Classificação das alterações histopatológicas nos fígados sob diferentes tratamentos.....	22
FIGURA 8. Fotomicrografias representativas do fígado sob diferentes tratamentos.....	23
FIGURA 9. Fotomicrografias representativas do testículo sob diferentes tratamentos.....	24
Tabela 3. Concentrações de cortisol, triiodotironina (T3) e hormônio do crescimento (GH) (ng/mL) em pedúnculos de <i>Astyanax lacustris</i> nos diferentes tratamentos.....	25
FIGURA 10. Interação água-substrato para os níveis de cortisol.....	26
Tabela 4. Concentrações dos biomarcadores de estresse oxidativo em brânquias.....	27
FIGURA 11. Interação água-substrato para as concentrações dos biomarcadores nas brânquias.....	28
Tabela 5. Concentrações dos biomarcadores de estresse oxidativo em fígado.....	29
FIGURA 12. Interação água-substrato para as concentrações dos biomarcadores do fígado.....	30
Tabela 6. Concentrações dos biomarcadores de estresse oxidativo em testículos.....	30
FIGURA 13. Interação água-substrato para para as concentrações dos biomarcadores do testículo....	31
Tabela 7. Concentrações em (mg/L) dos elementos químicos testados nas amostras de água.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
2.1. Coleta de Água e Rejeito.....	10
2.2. Desenho Experimental.....	11
2.3. Animais.....	11
2.4. Fase Experimental.....	12
2.5. Amostras de água.....	12
2.6. Eutanásia.....	12
2.7. Análise Hormonal.....	13
2.8. Análise Histopatológica.....	13
2.9. Estresse oxidativo.....	14
2.10. Análise Estatística.....	16
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Taxa de Sobrevivência.....	17
3.2. Crescimento.....	18
3.3. Análise Histopatológica.....	20
3.4. Análise Hormonal.....	25
3.5. Estresse Oxidativo.....	26
3.6. Análise de Água.....	32
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o mundo tem testemunhado desastres ambientais de grandes proporções causados pela atividade mineradora, cujos impactos persistem até os dias atuais. A extração desenfreada de chumbo em Kabwe, Zâmbia culminou em níveis dez vezes mais elevados do metal no sangue de crianças da região (BOSE-O'REILLY *et al.*, 2018). A extração de níquel em Norilsk, Rússia emite toneladas de dióxido de enxofre, composto precursor da formação de chuvas ácidas, que já destruiu milhares de hectares de florestas (KOTOV *et al.*, 1996). Nos Estados Unidos, o lago Berkeley Pit tornou-se ácido (ph 2.5) devido a oxidação da pirita de ferro presente nas minas de cobre abandonadas ao seu entorno (STIERLE & STIERLE, 2013). Em Aznalcollar, sul da Espanha, um rompimento de mina de pirita, em 1998, contaminou 2.000 hectares de terras agrícolas, atingindo o Parque Natural de Doñana (CARRASCO *et al.*, 2005). Em Baiyin, China, a extração contínua de cobre, chumbo e zinco por mais de meio século gerou uma poluição severa no solo, tornando-o inviável para a produção de alimentos (HE *et al.*, 2021). No Brasil, os rompimentos de barragens de mineração ocorridos em 2015 e 2019 são lembrados como os maiores desastres ambientais da história do país. Juntos, despejaram aproximadamente 52 milhões de metros cúbicos de rejeito nas bacias do Rio Doce e São Francisco, dois importantes recursos hídricos nacionais (MILANEZ *et al.*, 2021).

No contexto brasileiro, o desastre de Mariana, ocorrido em 2015, representa um dos maiores colapsos ambientais da história recente. O rompimento da barragem de Fundão despejou aproximadamente 39 milhões de metros cúbicos de rejeito na bacia do Rio Doce, resultando na morte de 19 pessoas e soterramento de 207 casas (HATJE *et al.*, 2017; CARMO *et al.*, 2017; ESCOBAR *et al.*, 2015, SEGURA *et al.*, 2016). A lama percorreu os rios Gualaxo do Norte, Carmo e Rio Doce, até desaguar no litoral do ES, provocando impactos severos à biodiversidade e comprometendo o abastecimento de água para milhares de pessoas (FERNANDES *et al.*, 2016; ANA, 2016).

A bacia percorre aproximadamente 86.000 km² dos estados de Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES) englobando cerca de 230 municípios (MOURÃO, 2023). Essa região possui um importante papel socioeconômico, pois fornece água para usos domésticos, agrícola, industrial e de mineração, além de contribuir para a geração de eletricidade (ANA, 2016; PIRH, 2010). Por ser uma importante fonte hídrica, e devido a sua localização no quadrilátero ferrífero, o Rio Doce enfrenta um processo de degradação ambiental devido às atividades antropogênicas. Entre elas destacam-se o despejo inadequado de esgoto urbano (MEDEIROS *et al.*, 2012), resíduos industriais e agropecuária (PETRUCIO *et al.*, 2005), e as atividades de mineração (DUARTE *et al.*, 2021; LICÍNIO *et al.*, 2016).

Estudos feitos após o desastre identificaram concentrações elevadas de vários metais na água do rio, dentre eles alumínio, ferro, manganês (OLIVEIRA & CAMILO, 2020), arsênio, cádmio, chumbo, níquel (Gabriel *et al.*, 2021) e cobre (CARVALHO *et al.*, 2017). Os metais encontrados nesses estudos já são amplamente conhecidos na literatura por sua alta toxicidade, sendo agentes xenobióticos que causam alteração da expressão gênica (SHAHJAHAN *et al.*, 2022), distúrbios na homeostase (BALALI-MOOD *et al.*, 2021), estresse oxidativo (JAISHANKAR *et al.*, 2014; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009), danos histológicos em diversos órgãos (PASCHOALINI *et al.*, 2019), além do seu potencial de bioacumulação e biomagnificação (SHARMA *et al.*, 2024; FERNANDES *et al.*, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas naturalmente no organismo e atuam na sinalização intracelular, mediação da expressão gênica, regulação do tônus vascular, e na apoptose (RIBEIRO *et al.*, 2006; DROGE, 2002). Porém, na presença de xenobióticos, a quantidade de EROs no organismo sofre um desbalanço, que culmina no processo de estresse oxidativo. Esse fenômeno se dá quando os níveis das espécies reativas no organismo são superiores às ações dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). Com a quantidade superior de EROS, os antioxidantes são incapazes de metabolizar esses radicais antes que os mesmos gerem danos celulares (ABDOLLAHI *et al.*, 2003; LU, WEI & LI, 2021; PETER *et al.*, 2022). Tais danos incluem a peroxidação lipídica, carbonilação das proteínas e danos ao DNA, o que gera disfunções e conseqüentemente, a morte celular (AYALA *et al.*, 2014; VALKO *et al.*, 2007; LUSHCHAK & STOREY, 2021).

Devido a sua relação direta com danos e disfunções celulares, o estresse oxidativo se tornou um mecanismo amplamente utilizado em estudos fisiológicos para detectar os impactos ambientais a nível celular e possíveis intervenções de remediação (VERMONT *et al.*, 2021). A quantificação de biomarcadores-chave — como o malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas (PC) — auxiliam na compreensão mais profunda de como as diferentes condições ambientais e experimentais provocam alterações fisiológicas (ADAMS *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo também possui implicações em nível ecológico, pois influencia indiretamente na compensação energética dos indivíduos. Pois, para metabolizar as EROs, o organismo direciona energia para o aumento da produção de mais enzimas antioxidantes, reduzindo o recurso energético disponível para outros parâmetros, como o crescimento e reprodução (MONAGHAN *et al.*, 2008). Além disso, o excesso de EROs pode prejudicar a função imunológica e provocar respostas inflamatórias, tornando-os mais suscetíveis a doenças e alterações ambientais (PARK *et al.*, 2020, MENON *et al.*, 2023).

Nesse cenário, os peixes são ótimos modelos para estudos toxicológicos, pois atuam como

bioindicadores da qualidade da água por serem sensíveis a distúrbios e estarem em contato direto com os contaminantes aquáticos (CARVAN, 2007). O peixe *Astyanax lacustris* (Lütken, 1885), conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, é uma espécie nativa da bacia do Rio Doce, pertence à classe Teleostei, ordem Characiformes. Esse peixe habita principalmente ambientes como lagos, rios e represas, frequentemente encontrados em áreas com vegetação aquática (LIMA, 2003). Além de desempenhar um papel fundamental na cadeia alimentar como presa para espécies maiores de peixes e aves, também é um bioindicador da qualidade do ecossistema aquático (SPOSITO *et al.*, 2019).

O nosso objetivo é avaliar os efeitos do rejeito de mineração na fisiologia e histologia de *Astyanax lacustris*, com ênfase no estresse oxidativo, taxa de sobrevivência, concentrações hormonais, crescimento e danos histopatológicos. Nossa hipótese sugere que o rejeito terá um efeito tóxico mais elevado quando comparado com a água do rio “degradado”. Adicionalmente, hipotetizamos que os efeitos tóxicos dos resíduos de mineração quando associados com os poluentes já presentes na água do rio, são acentuados, apresentando um efeito sinérgico na fisiologia do peixe. Além disso, este estudo busca fornecer informações para o desenvolvimento de diretrizes de gestão ambiental, visando a conservação de espécies nativas da bacia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada e conduzida de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, sob o protocolo 071/2024.

2.1. Coleta de Água e Rejeito

As amostras de água do rio e rejeitos de mineração foram coletadas no Rio Gualaxo do Norte (Figura 1) (coordenadas: 20°15'31.1"S 43°21'43.5"W), localizado na bacia hidrográfica do Rio Doce, a aproximadamente 8,81 km de distância à jusante da barragem, e foram armazenadas em tambores plásticos por duas semanas até o início do experimento. A areia utilizada como substrato controle foi adquirida da Fibrarp Piscinas (coordenadas: 20°39'26.8"S 42°51'19.5"W), imersa em solução de água sanitária e água (0,5 mL/L) por 24 horas. Após esse período, a areia foi lavada com água corrente para remover qualquer resíduo da solução. A água controle utilizada foi devidamente desclorada com a utilização de um aerador por sete dias para garantir total evaporação do cloro.

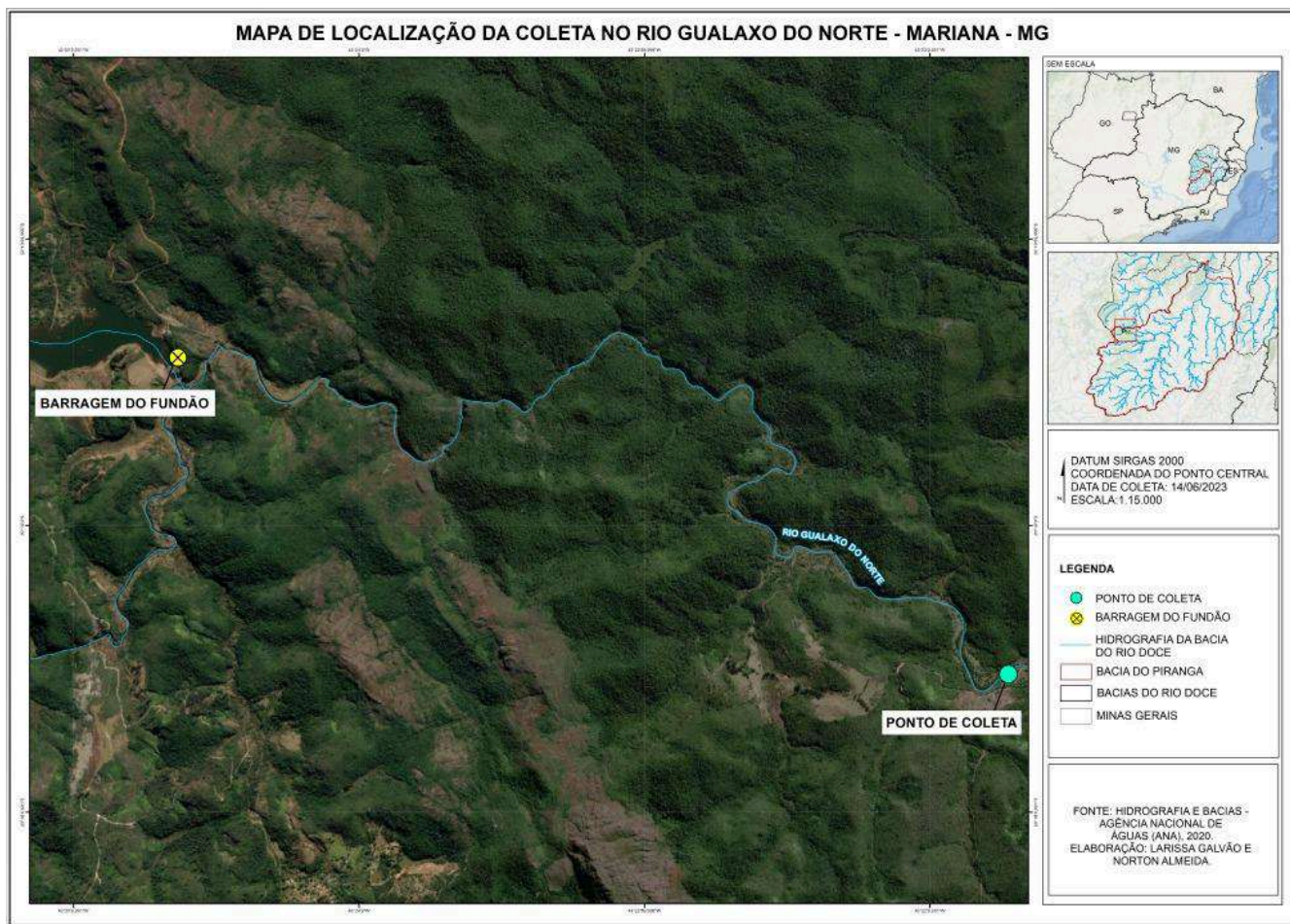


FIGURA 1: Mapa de localização de coleta da água do rio e da lama de rejeito. Em amarelo temos o local da quebra da barragem do Fundão. O ponto de coleta está destacado em azul à direita. Fonte: Norton Almeida.

2.2. Desenho Experimental

A composição dos aquários foi dividida em dois parâmetros, sendo o tipo da água utilizada e o tipo de substrato. Dessa forma, temos quatro tratamentos distintos: grupo controle contendo água de torneira desclorada com substrato arenoso (TA), água do rio com substrato arenoso (RA), água de torneira desclorada com o substrato de rejeito (TR) e água do rio e substrato de rejeito (RR). Foram feitas 5 réplicas por tratamento, totalizando 20 aquários, cada um com 55L. Todos os tanques foram equipados com filtro biológico, termômetro, aquecedores, refúgios e uma tela preta.

2.3. Animais

Os peixes (*Astyanax lacustris*) foram adquiridos de uma piscicultura comercial, Fazenda Lindóia, em Teixeira-MG, 30 dias após a eclosão, medindo entre 2-3 centímetros e foram aclimatados por uma semana após o transporte. Durante esse período, foi realizado manejo com sal

de cozinha na concentração de 4g/L para prevenção de infecções fúngicas, de acordo com a faixa de tolerância da espécie descrito por Salaro *et al.*, 2015. Os peixes foram alojados em dois tanques de 500 litros contendo água desclorada e aeração constante, com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. As condições experimentais foram monitoradas, mantendo o oxigênio dissolvido aproximadamente a 7 $\mu\text{g/mL}$ e pH ajustado entre 7,0 e 7,2. Foi utilizado o oxímetro digital Traceable® (Texas, EUA) para mensuração da temperatura e oxigênio dissolvido, enquanto o pH foi mensurado com medidor digital Kasvi® (Paraná, Brasil).

2.4. Fase Experimental

Os peixes foram pesados, selecionados na faixa de 0,5 - 1,5g e distribuídos entre os 20 aquários, sendo 25 indivíduos por aquário, totalizando 500 peixes. Os pesos iniciais dos indivíduos foram analisados para averiguar a uniformidade no início da exposição. Tanto os juvenis machos quanto fêmeas foram incluídos no estudo. O período experimental foi de 35 dias. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com uma ração comercial contendo 36% de proteína bruta. Oxigênio dissolvido, pH e temperatura foram monitorados usando equipamento multiparâmetro a fim de garantir que as condições experimentais se mantivessem uniformes entre os tratamentos.

Os aquários foram sifonados a cada dois dias para a remoção de fezes. Durante a sifonagem, cerca de 3-4 litros de água foram removidos e imediatamente substituídos pela água do tratamento correspondente. A mortalidade dos peixes foi registrada diariamente durante todo o período de exposição.

2.5. Amostras de água

No 17º dia da fase experimental, 20 amostras de água foram coletadas, utilizando tubo falcon de 15 mL, sendo uma para cada aquário. Aproximadamente 10 mL de água foram coletados da coluna d'água sem agitar o substrato, mantendo uma profundidade consistente de aproximadamente 30 cm da superfície. Os tubos Falcon foram armazenados a -20°C e encaminhados para a empresa Tommasi Ambiental cujas análises de quantificação de metais foram realizadas utilizando Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) da marca Agilent.

2.6. Eutanásia

Após 35 dias, os peixes foram coletados com redes e imediatamente anestesiados em solução Mesilato de Tricaína (MS-222) na concentração de 500 mg/L, de acordo com as diretrizes de bem-estar animal da American Veterinary Medical Association (AVMA). Oito amostras dos tecidos de brânquias, fígado e testículos foram removidos para análise de estresse oxidativo, com o

animal mantido em banho de gelo. Para análise hormonal, uma amostra de músculo do pedúnculo caudal foi removido de 8 indivíduos por tratamento. Os tecidos foram congelados imediatamente após a remoção com nitrogênio líquido e posteriormente armazenados no ultrafreezer à -80° C até o momento da análise. Para fígado e gônadas, foi realizado um pool com 4 amostras para obter uma quantidade adequada para análise.

Para histologia, 6 amostras de tecidos de brânquias, fígado e testículos foram coletados por tratamento, fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e, posteriormente, desidratados com álcool 70% para análise posterior.



FIGURA 2. Lambari-do-rabo-amarelo.

2.7. Análise Hormonal

As amostras de pedúnculo foram processadas de acordo com Guest *et al.* (2016), adaptado por Destro *et al.* (2021), com as seguintes adaptações. A pele e os ossos do pedúnculo caudal foram removidos, e o tecido restante foi pesado (100 mg). O tecido foi então homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato contendo 1 mM de 6-propil-2-tiouracil (PTU). Após a homogeneização, as amostras foram lavadas com 10 mL de éter etílico, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, e a fase etérea foi transferida para tubos de ensaio. A etapa de lavagem foi repetida mais duas vezes para garantir a máxima extração. Finalmente, o éter foi evaporado em banho-maria a 40°C, e as amostras foram reconstituídas em 500 µL de tampão de ensaio e armazenadas a -80°C até a leitura em leitora de microplacas (ELISA). Para analisar as amostras, foram utilizados kits de imunoenensaio enzimático comerciais (USA Diagnóstica) para os hormônios triiodotironina (T3), tetraiodotironina (T4), hormônio do crescimento (GH), cortisol e testosterona, seguindo as instruções do fabricante.

2.8. Análise Histopatológica

Os tecidos foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e em seguida desidratados em séries crescentes de etanol. Logo após, foram embebidos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Posteriormente, foram obtidas secções

semi-seriadas de 3 µm de espessura, com espaçamento regular de 20 µm entre cortes, até esgotamento total do bloco, sendo obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2255). Os cortes foram corados com azul de toluidina. As lâminas histológicas foram analisadas em sua totalidade e fotografadas (ocular 10X e objetiva 40X) em 10 campos aleatórios para identificar os efeitos dos tratamentos no tecido branquial e hepático (MARCON *et al.*, 2016) e nos testículos (PASCHOALINI *et al.*, 2019). Essas alterações foram comparadas ao padrão organizacional das brânquias, fígados e testículos nas lâminas do grupo controle.

As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente pelo cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), com base na gravidade de cada lesão. As lesões observadas nos tecidos foram classificadas de acordo com Marcon *et al.* (2016) e subdividido em três estágios progressivos com base na gravidade das lesões e no potencial de recuperação:

SI: Alterações leves que não alteram a função do tecido.

SII: Alterações moderadas que alteram parcialmente a função do tecido.

SIII: Alterações severas que alteram completamente a função do tecido.

Para o cálculo do IAH foi utilizada a seguinte equação proposta por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994):

$$IAH = 10^0 \cdot \sum SI + 10^1 \cdot \sum SII + 10^2 \cdot \sum SIII$$

onde SI, SII e SIII correspondem ao número de alterações nos estágios I, II e III, respectivamente. O valor do IAH para cada animal foi calculado pela soma do número de lesões em cada um dos três estágios, multiplicado pelo índice de fase correspondente. Os valores do IAH foram classificados em cinco categorias: 0-10: Função normal do órgão, 11-20: Pequenas alterações, 21-50: Alterações moderadas, 51-100: Alterações graves e >100: Alterações irreversíveis do órgão.

2.9. Estresse oxidativo

As amostras para análise de estresse oxidativo foram pesadas em 100 mg e homogeneizadas com 1 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4) em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante e o pellet foram armazenados a -80°C. Em todas as análises, foram realizados ensaios colorimétricos por espectrometria para detectar biomarcadores de estresse, entre eles malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PC) e óxido nítrico (NO), além das enzimas antioxidantes glutathione s-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Todas as análises foram conduzidas dentro de uma semana da preparação da amostra devido à alta instabilidade desses componentes (JANSEN *et al.*, 2013).

2.9.1. Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela adaptação do protocolo de Hadwan e Abed (2016), usando H_2O_2 como substrato. O procedimento foi conduzido com duas microplacas: uma placa de teste usando peróxido de hidrogênio (20 mM) como reagente e uma placa de controle usando apenas solução tampão de fosfato de sódio e potássio (pH 7,4). Primeiro, 5 μL da amostra foram pipetados em ambas as placas. Em seguida, 100 μL de tampão foram adicionados à placa de controle. A diluição seriada da curva foi então realizada com água destilada e peróxido de hidrogênio para ambas as placas. Finalmente, 100 μL de H_2O_2 foram pipetados na placa de teste. Após 3 minutos, 150 μL de molibdato de amônio (32.4 mmol/L) foram adicionados a ambas as placas usando uma pipeta multicanal, e as placas foram submetidas à análise espectrofotométrica. A absorbância foi registrada a 375 nm, e a atividade da catalase foi expressa como CAT/KU de proteína.

2.9.2. Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada usando o protocolo de Dieterich *et al.* (2000). Primeiro, 30 μL da amostra foram pipetados em duplicatas na microplaca. 45 μL de tampão fosfato (pH 8,0; 5 mmol/L) foram adicionados ao poço rotulado como “branco”, 30 μL de tampão ao poço rotulado como “padrão” e 99 μL de tampão a todos os outros poços usando uma pipeta multicanal. Então, 6 μL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (1,33 mM) e 15 μL de pirogalol (0,0991 mM) foram pipetados em todos os poços. A placa foi incubada na estufa por 15 minutos a 40°C. Finalmente, a reação foi interrompida com 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em todos os poços. A absorbância foi registrada a 570 nm, e a atividade da SOD foi calculada como unidades por miligrama de proteína.

2.9.3. Glutathiona S-Transferase

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi determinada de acordo com Habig *et al.* (1974). Primeiro, o espectrofotômetro foi zerado usando 1 mL de tampão fosfato (pH 7,0) na cubeta. O branco foi preparado em triplicatas com 980 μL de tampão, 10 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 10 μL de L-glutathiona reduzida (GSH) (1 mmol/L). Para as amostras, 970 μL de tampão, 10 μL de CDNB, 10 μL de amostra e 10 μL de GSH foram pipetados na mesma ordem, também em triplicatas, e o aumento da absorbância foi monitorado ao longo de 60 segundos. A absorbância foi registrada a 340 nm, e a atividade da GST foi expressa como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$.

2.9.4. Proteína Carbonilada

A carbonilação de proteínas (PC) foi quantificada usando o protocolo definido por Levine *et al.* (1994). Primeiro, 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% foi adicionado ao pellet obtido da homogeneização da amostra. A mistura foi agitada em vórtice e dividida em duas alíquotas de 500 µL. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 25°C, e o sobrenadante foi descartado. A um tubo, 500 µL de solução de HCl (2 M) foram adicionados, enquanto 500 µL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) foram adicionados ao outro tubo. Os tubos foram incubados no escuro por 30 minutos, depois centrifugados, e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido com mais 500 µL de TCA, seguido de agitação em vórtice, centrifugação e remoção do sobrenadante. As amostras foram então lavadas sucessivamente com etanol e acetato de etila (1:1) para remover o excesso de DNPH. Finalmente, as amostras foram lavadas com solução de lauril sulfato de sódio 6%, centrifugadas uma última vez, e o sobrenadante foi pipetado em placas de ELISA para leitura espectrofotométrica a 370 nm.

2.9.5. Malondialdeído

O malondialdeído (MDA) foi quantificado usando o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). Primeiro, 200 µL de amostra foram pipetados em cada microtubo em duplicata. Em seguida, 400 µL de solução TBARS (TCA 15%, TBA 0,375% e HCL 2,146%) foram adicionados a todas as amostras e à curva de calibração. Os tubos foram colocados em banho-maria por 40 minutos a 90°C. Após o banho-maria, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, 600 µL de n-butanol foram adicionados a todas as amostras, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi coletado e sua absorbância foi lida a 540 nm.

2.9.6. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) foi quantificado usando o protocolo definido por Tsikas (2007), que envolve a criação de uma curva de calibração com nitrito de sódio. Para as amostras, 50 µL de amostra foram pipetados em cada poço em duplicata. Em seguida, 100 µL de uma solução de sulfanilamida 1% e solução de dicloridrato de naftil etileno amida a 0,1% foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm.

2.9.7. Proteínas Totais

As proteínas totais nas amostras foram medidas para uso em cálculos e estatísticas para os outros biomarcadores. O método usado, conforme citado por Lowry *et al.* (1951), envolve diluir as

amostras 20 vezes e induzir uma reação de cor com uma solução contendo carbonato de sódio (2.94%), sulfato de cobre (0.02%), hidróxido de sódio (0.39%) e tartarato de sódio (0.04%). Uma curva padrão foi preparada usando albumina de soro bovino diluída em série.

2.10. Análise Estatística

Para a análise histológica, os dados foram avaliados usando o software Statistica 7.0 usando análise de variância (ANOVA). Após o teste de distribuição normal, os dados do Índice de Mudança Histopatológica (HAI) foram comparados entre os grupos controle e tratado usando análise de variância one-way seguida pelo teste de Duncan. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado. $P < 0,05$ foi usado como critério de significância. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

As análises estatísticas da mortalidade, estresse oxidativo, hormônios e das amostras de água foram realizadas usando o RStudio versão 2024.9.1.394 (Posit Team, 2024). Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov), quanto à dispersão dos dados e quanto à presença de outliers. Nos casos em que não atenderam à suposição de normalidade, foi aplicada uma transformação logarítmica. Em seguida, foi aplicado o teste ANOVA one-way seguida pelo teste de Duncan. Para a análise de interação água-substrato, foi conduzida uma ANOVA two-way, considerando a composição de cada tratamento. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$) e os resultados são apresentados como média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Taxa de Sobrevivência

Não houve diferença significativa na mortalidade após o tempo total de exposição, entre os tratamentos ($p=0,06$), como indicado na Figura 3.

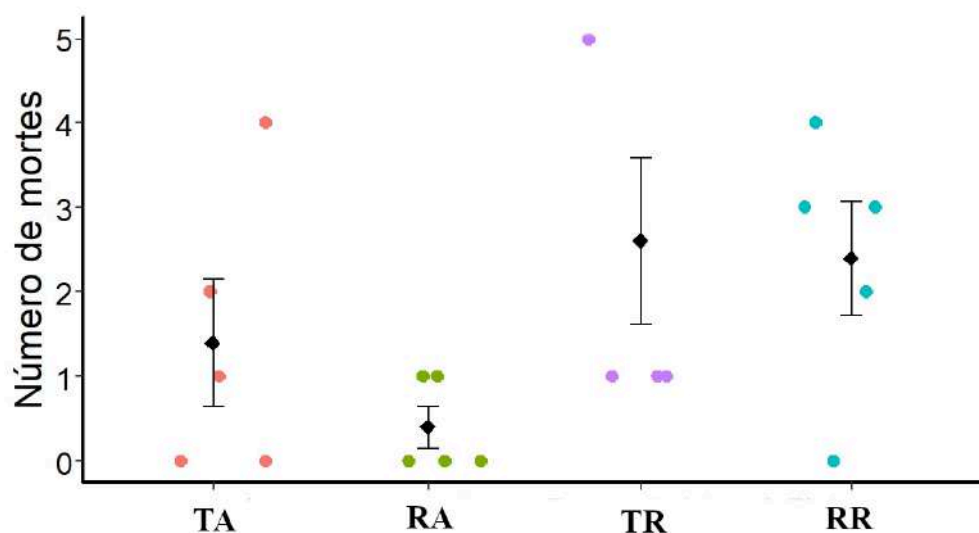


FIGURA 3: Mortalidade por tratamento - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR). Cada ponto no gráfico representa um aquário. Os resultados indicam que os tratamentos não possuem diferença significativa no número de mortos ($p=0,06$).

Avaliamos os efeitos dos tratamentos sobre o tempo de sobrevivência utilizando a distribuição de Weibull (Figura 4). Inicialmente, ajustamos o modelo considerando os quatro tratamentos isolados, e nenhum apresentou efeito significativo individualmente ($p>0,1$). No entanto o modelo global foi significativo (AIC: 446,91; $X^2= 11,36$; $p = 0,009$), quando comparado com o modelo nulo. Ao realizar a simplificação do modelo através da junção dos tratamentos TR e RR, obtivemos um melhor ajuste (AIC: 444,00) que revelou uma redução significativa no tempo de sobrevivência para os tratamentos com rejeito como substrato ($\beta = -0,263$; $p = 0,014$). Além disso, o modelo ajustado também foi significativo ($X^2= 8,23$; $p = 0,0041$), indicando que o rejeito pode estar diretamente associado com a diminuição da sobrevivência dos peixes.

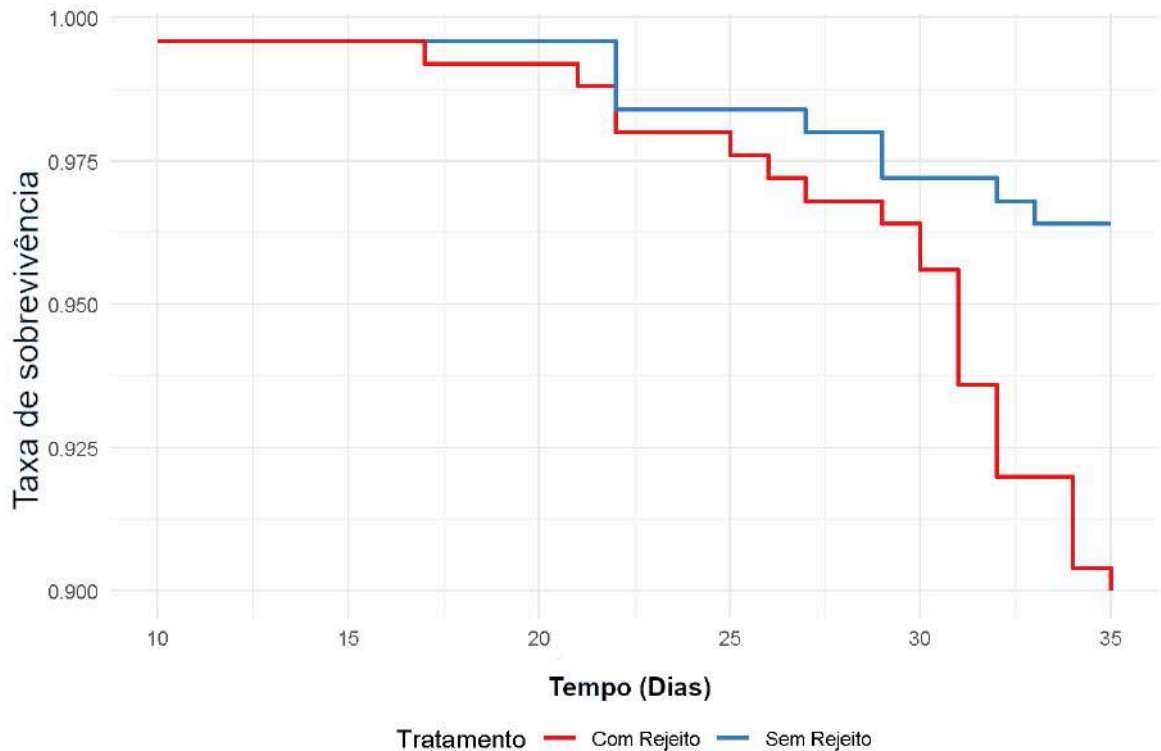


FIGURA 4. Sobrevivência (%) de peixes comparando tratamentos com e sem rejeito ao longo do tempo de exposição. A probabilidade de sobrevivência permaneceu consistentemente alta (>95%) para ambos os grupos até o dia 20, após o qual os tratamentos com rejeito mostraram um declínio mais acentuado, atingindo aproximadamente 90% de sobrevivência no dia 35. O grupo sem rejeitos manteve maiores taxas de sobrevivência, terminando em aproximadamente 96% no dia 35.

3.2. Crescimento

O grupo controle (TA) apresentou o maior ganho de peso médio (1,75g), enquanto os demais grupos apresentaram ganhos de pesos menores: RA (1,34g), TR (1,14g) e RR (1,35g).

$$\text{Ganho de peso} = \left(\frac{\sum \text{PesoFinal}}{N} \right) - \left(\frac{\sum \text{PesoInicial}}{N} \right).$$

N: Número total de indivíduos

Os resultados da interação água-substrato no peso final dos peixes (Figura 5- A) indicam que a presença do rejeito em associação com a água controle reduziu significativamente o seu peso ($F_{1,224} = 20,7$; $p < 0,001$). No entanto, nenhum efeito significativo foi observado na associação do rejeito com a água do rio ($p = 0,89$). Já no comprimento final, os resultados indicam que a presença

do rejeito em associação com a água controle reduziu significativamente o comprimento dos peixes ($F_{1,224} = 47.23$, $p < 0,001$), enquanto que na água de rio, a presença do rejeito contribuiu significativamente para um aumento no comprimento ($F_{1,228} = 45,48$; $p < 0,001$), como indicado na Figura 5 - B.

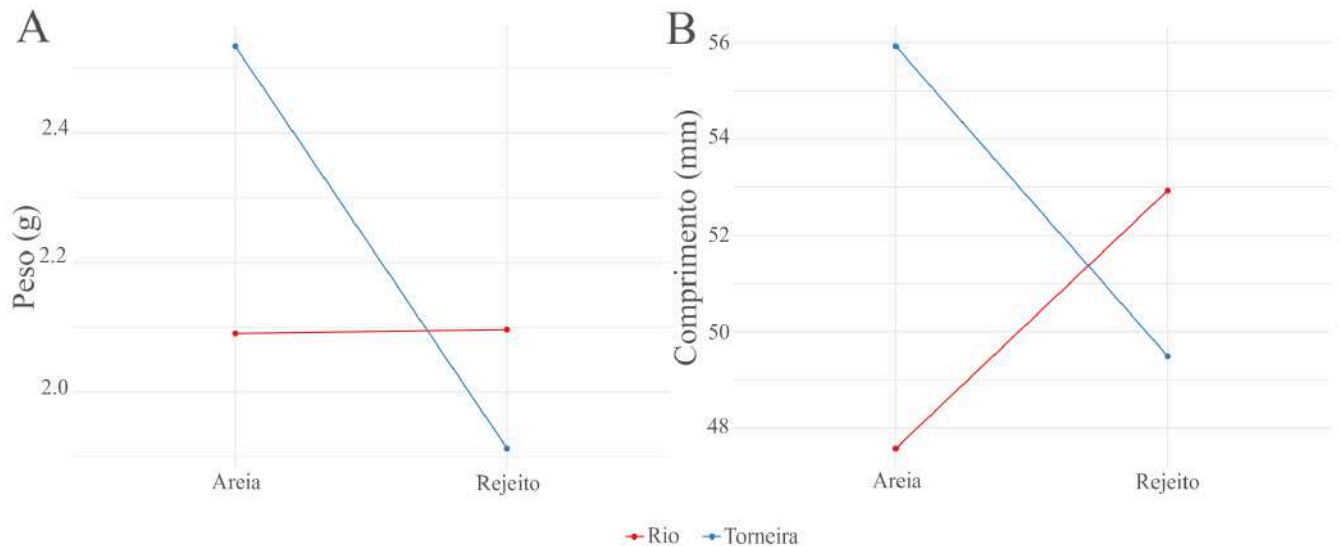


FIGURA 5. A) Efeitos da interação água-substrato no peso final dos animais (g). Os peixes nos tratamentos com a água do rio mantiveram pesos consistentes em todos os substratos, enquanto aqueles em água tratada exibiram uma diminuição significativa do peso na presença do rejeito como substrato. **B)** Efeitos da interação água-substrato no comprimento final dos animais (mm). Peixes na água do rio mostraram um aumento significativo no comprimento quando em associação com o substrato de rejeito ($p < 0,001$), enquanto aqueles na água tratada exibiram uma diminuição acentuada na presença do rejeito ($p < 0,001$).

Uma comparação utilizando os quatro tratamentos (Figura 6 - A) revelou uma redução significativa no peso em todos os grupos tratados quando comparado ao grupo controle ($F_{3,452} = 7,70$; $p < 0,0001$). Já no comprimento, os resultados revelaram reduções significativas em relação ao grupo controle ($F_{3,452} = 37,0$, $p < 0,0001$), porém com diferenças significativas entre eles, como indicado na Figura 6 - B.

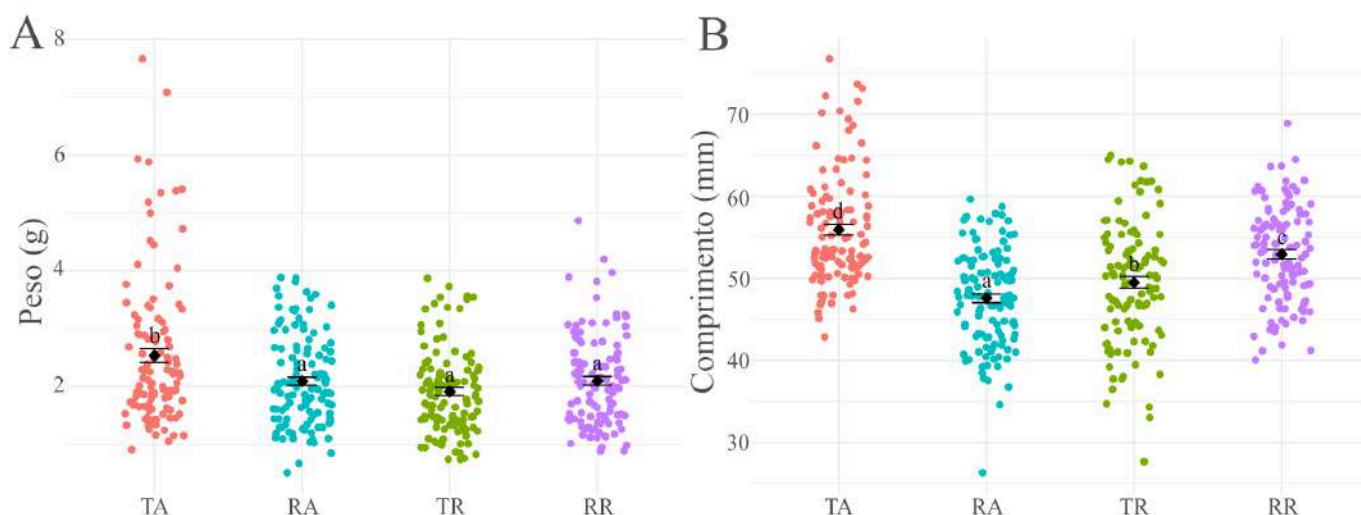


FIGURA 6. A) Peso final (g) dos animais distribuídos nos quatro tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR). O peso final dos animais dos grupos tratados foi significativamente menor comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). **B)** Gráfico do comprimento (mm) para os quatro tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR). O grupo controle difere significativamente dos demais tratamentos ($p < 0,0001$).

3.3. Análise Histopatológica

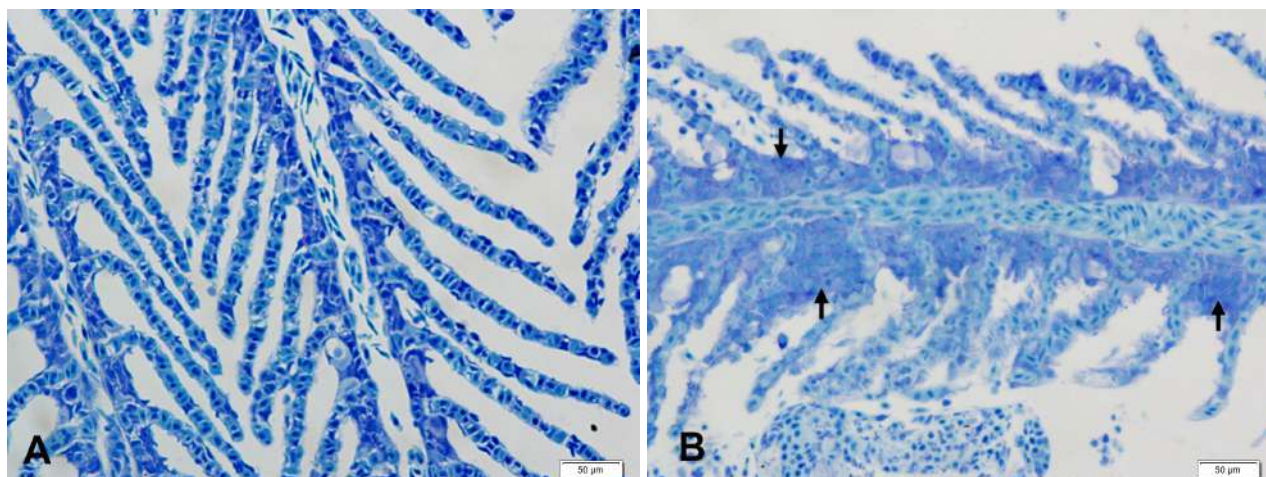
3.3.1. Brânquias

As características morfológicas das brânquias de *Astyanax lacustris* no grupo controle são caracterizadas por uma estrutura integrada e organizada em todo o comprimento das lamelas primárias e secundárias. As lamelas primárias apresentam um epitélio branquial estratificado, composto por diferentes tipos de células: células escamosas (epitélio respiratório) que recobrem as células pilares; células de cloreto, localizadas perto da base entre as lamelas primárias, que são células maiores, globosas com um núcleo central; e células de muco, encontradas nas bordas externas e internas dos filamentos branquiais. Alterações morfológicas dos estágios I e II (SI e SII) nas brânquias foram observadas com mais frequência nos grupos tratados (Tabela 1). O IAH das brânquias nos diferentes grupos apresentou maior valor ($p < 0,05$) nos grupos tratados (RA = $8,25 \pm 5,76$; TR = $8,5 \pm 6,9$; RR = $8,25 \pm 6,65$) em comparação ao grupo controle ($0,66 \pm 0,57$).

Tabela 1. Classificação e pontuação das frequências de alterações histopatológicas nas brânquias dos grupos controle e tratado.

ALTERAÇÕES NAS BRÂNQUIAS	TA	RA	TR	RR
1. Alterações leves (SI)				
Hipertrofia do epitélio lamelar	0	0	0	0
Elevação do epitélio lamelar	0	0	+	0
Hiperplasia do epitélio lamelar	0	+	+	+
Desarranjo lamelar	0	0	0	0
Congestão vascular	+	++	++	++
Proliferação das células de cloreto	0	++	+++	+++
Proliferação das células de muco	0	0	0	0
Dilatação do eixo sanguíneo	0	++	++	++
2. Alterações moderadas (SII)				
Fusão de lamelas	0	+	+	+
Hemorragias com ruptura do epitélio	0	0	0	0
Aneurisma lamelar	0	0	0	0
3. Alterações severas (SIII)				
Necrose	0	0	0	0
Fibrose	0	0	0	0

Os scores representam a frequência de aparecimento de alterações da seguinte forma: Em 0=ausente; + = raramente frequente; ++ = frequente; +++ = com muita frequência para os tratamentos controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).



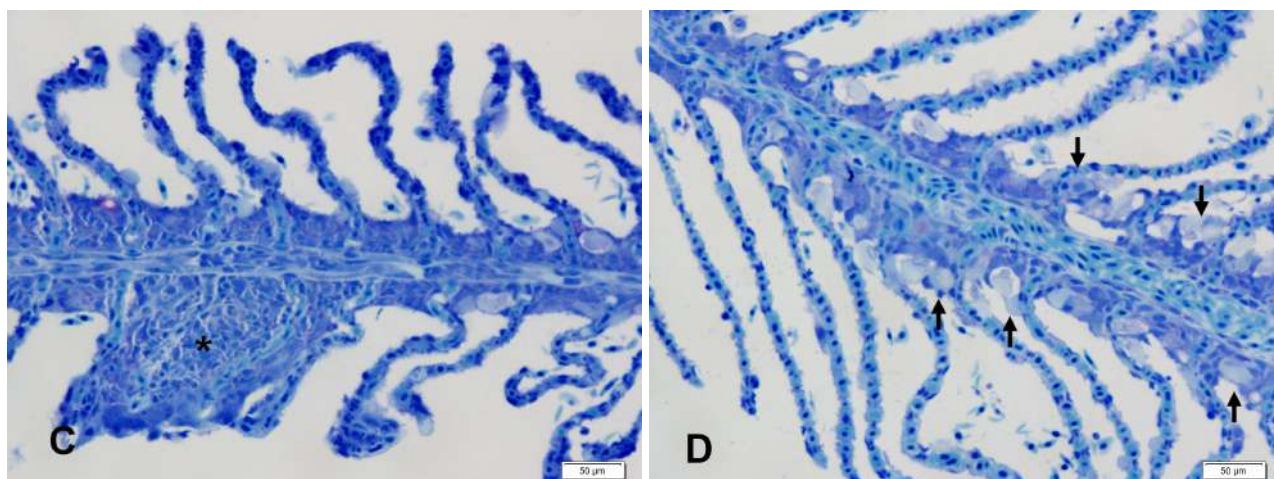


FIGURA 7. Fotomicrografias representativas de brânquias coradas com azul de toluidina mostrando alterações histopatológicas sob diferentes tratamentos (barra de escala = 50 μ m). **(A)** Brânquia controle mostrando estrutura e organização lamelar normais; **(B)** Tratamento contendo água de torneira e rejeito (TR) mostrando hiperplasia do epitélio lamelar (setas); **(C)** Tratamento contendo água do rio e areia (RA) exibindo fusão lamelar (asterisco); **(D)** Tratamento contendo água do rio e rejeito (RR) demonstrando proliferação de células de cloreto (seta). Observe as alterações progressivas na morfologia das brânquias entre os tratamentos em comparação com a condição de controle.

3.3.2. Fígado

As características morfológicas dos fígados de *Astyanax lacustris* no grupo controle foram caracterizadas por hepatócitos hexagonais com citoplasma granular e vacuolizado e núcleo central arredondado. Os hepatócitos estavam organizados em cordões, margeando os sinusóides. Alterações morfológicas de estágios I e II (SI e SII) nos fígados foram mais frequentemente observadas nos grupos tratados (Tabela 2). O IAH dos fígados nos diferentes grupos tratados apresentou valores significativamente maiores ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle: RA = $22,00 \pm 9,30$, TR = $27,67 \pm 19,72$, RR = $19,67 \pm 4,80$, versus grupo controle ($0,75 \pm 0,50$). As alterações observadas nos fígados não foram graves, sendo a maioria classificada como estágios I e II, indicando danos leves a moderados ao tecido hepático.

Tabela 2. Classificação e score das frequências das alterações histopatológicas nos fígados do grupo controle e grupos tratados.

ALTERAÇÕES HEPÁTICAS	TA	RA	TR	RR
1. Alterações leves (SI)				

Atrofia nuclear	0	0	0	0
Deformação do contorno celular	0	0	0	0
Deformação do contorno nuclear	0	0	+	0
Hipertrofia celular	0	0	+	+
Hipertrofia nuclear	0	+	+	0
Núcleo na periferia da célula	0	0	0	0
Vacuolização citoplasmática	++	+++	++++	+++
2. Alterações moderadas (SII)				
Degeneração citoplasmática	0	+	++++	+++
Degeneração nuclear	0	0	+	0
Núcleos picnóticos	0	0	+	+
Rompimento celular	0	+	+	0
Hiperemia	0	+++	+++	+++
Ruptura de vasos	0	0	+	0
3. Alterações severas (SIII)				
Necrose focal	0	0	0	0

Os scores representam a frequência de aparecimento de alterações da seguinte forma: Em 0=ausente; + = raramente frequente; ++ = frequente; +++ = com muita frequência; ++++ extremamente comum para os tratamentos controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).

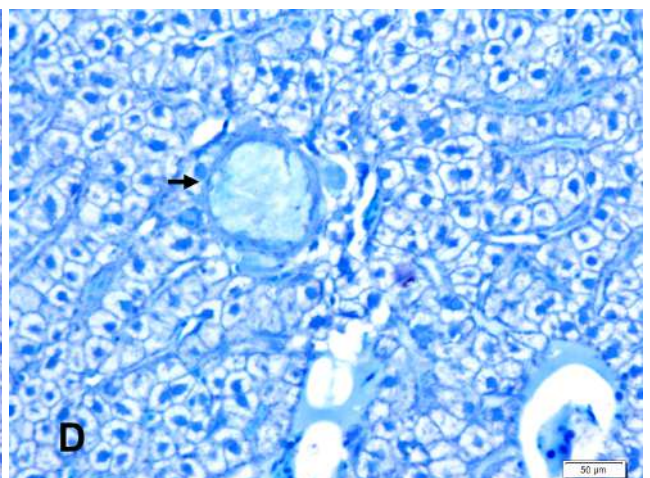
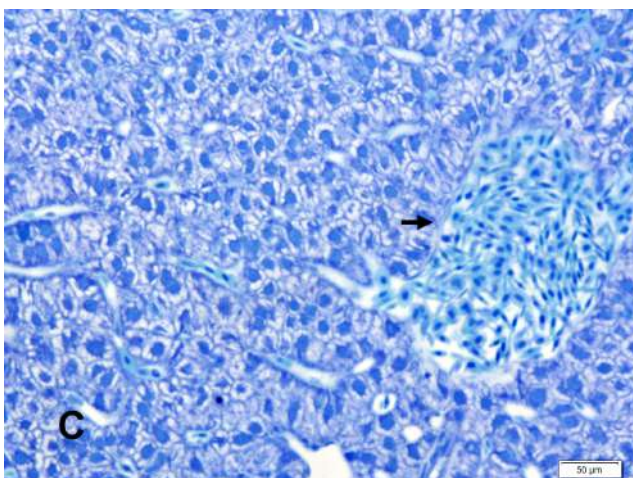
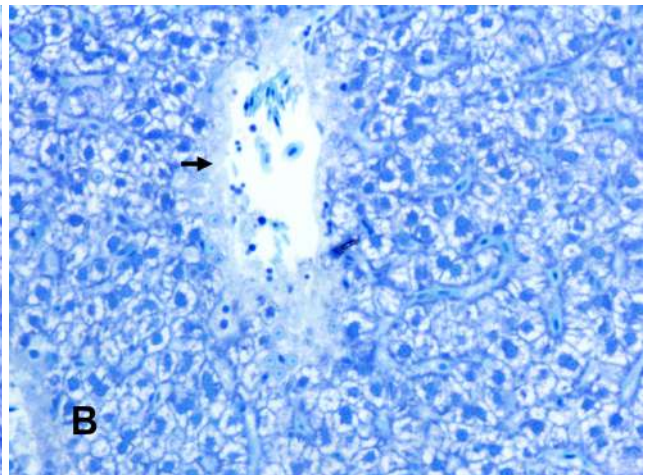
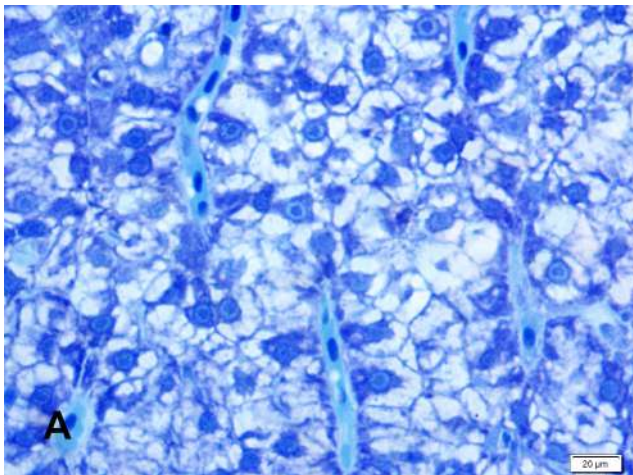


FIGURA 8. Fotomicrografias representativas do fígado corado com azul de toluidina mostrando alterações histopatológicas sob diferentes tratamentos (barra de escala = 50 µm). **(A)** Fígado controle mostrando estrutura e organização normais (barra de escala = 20 µm); **(B)** Tratamento com água de torneira e rejeito (TR) mostrando ruptura do vaso (seta); **(C)** Tratamento com água do rio e areia (RA) exibindo hiperemia (seta); **(D)** Tratamento com água do rio e rejeito (RR) demonstrando a presença de um vacúolo proteináceo (seta). Observe as alterações progressivas na morfologia do fígado entre os tratamentos em comparação com a condição de controle.

3.3.3. Testículo

As características morfológicas dos testículos de *Astyanax lacustris* nos grupos controle e tratado apresentam organização cística, com várias células em diferentes estágios de espermatogênese, lúmen amplo e presença de espermatozoides, indicando testículos em estágios de maturação e maduros. Não foram observadas alterações nos testículos dos peixes dos grupos tratados expostos aos resíduos e à água do Rio Doce que comprometesse a função do órgão.

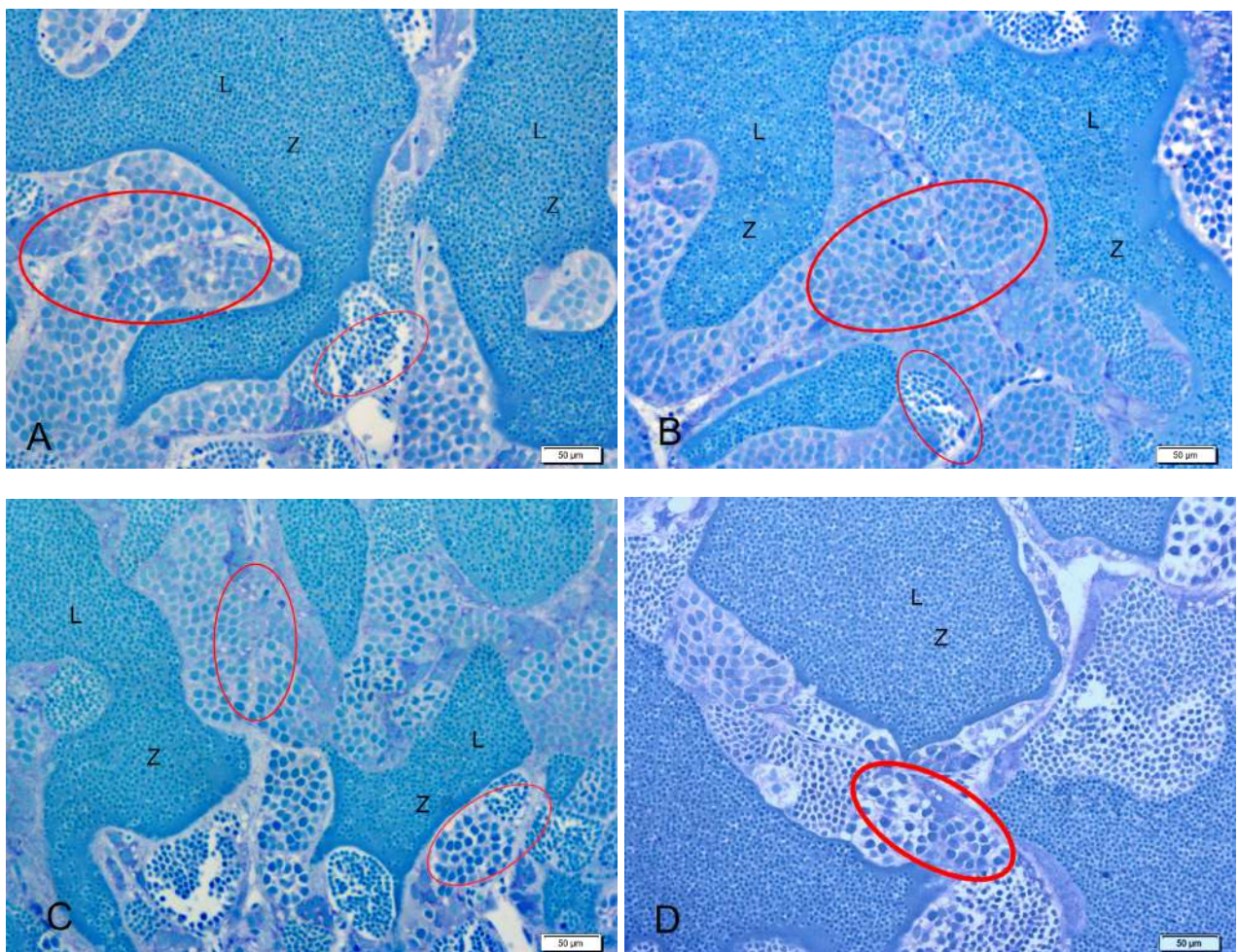


FIGURA 9. Fotomicrografias representativas do testículo corado com azul de toluidina mostrando alterações histopatológicas sob diferentes tratamentos (barra de escala = 50 µm). Em A temos o grupo controle, em B o tratamento RA, em C o tratamento TR e em D o tratamento RR. Todos são representados com o testículo saudável com cistos de células da espermatogênese (círculo vermelho) e presença de lúmen amplo (L) com espermatozoides (Z).

3.4. Análise Hormonal

As análises hormonais revelaram aumento significativo para os níveis de cortisol ($F_{2,31} = 24,8$, $p < 0,001$), com alterações observadas exclusivamente no tratamento TR em comparação aos outros tratamentos, como indicado na Tabela 3. Não houveram resultados significativos para T3 ($p = 0,35$) e GH ($p = 0,67$). Os valores de absorvância para testosterona e T4 medidos pelo espectrofotômetro estavam fora do intervalo esperado pela curva padrão, e portanto não foram identificados.

Tabela 3. Concentrações de cortisol, triiodotironina (T3) e hormônio do crescimento (GH) (ng/mL) em pedúnculos de *Astyanax lacustris* nos diferentes tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).

Hormônios	TA	RA	TR	RR
Cortisol	0.44 ± 0.1 (a)	0.67 ± 0.12 (a)	1.37 ± 0.11(b)	0.42 ± 0.09 (a)
T3	0.33 ± 0.06 (a)	0.26 ± 0.04 (a)	0.33 ± 0.05 (a)	0.22 ± 0.05 (a)
GH	0.008 ± 0.01 (a)	0.036 ± 0.02 (a)	0.034 ± 0.02 (a)	0.022 ± 0.02 (a)

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos tratados (água do rio e areia -RA, água de torneira e rejeito-TR e água do rio e rejeito -RR) em comparação com o grupo controle (TA).

Os resultados da interação água-substrato (Figura 10) indicam que os níveis de cortisol foram influenciados pela exposição do rejeito em associação com a água tratada ($F_{1,16} = 38,6$; $p < 0,001$). Enquanto que na água do rio, o substrato não apresentou uma influência significativa ($p = 0,14$).

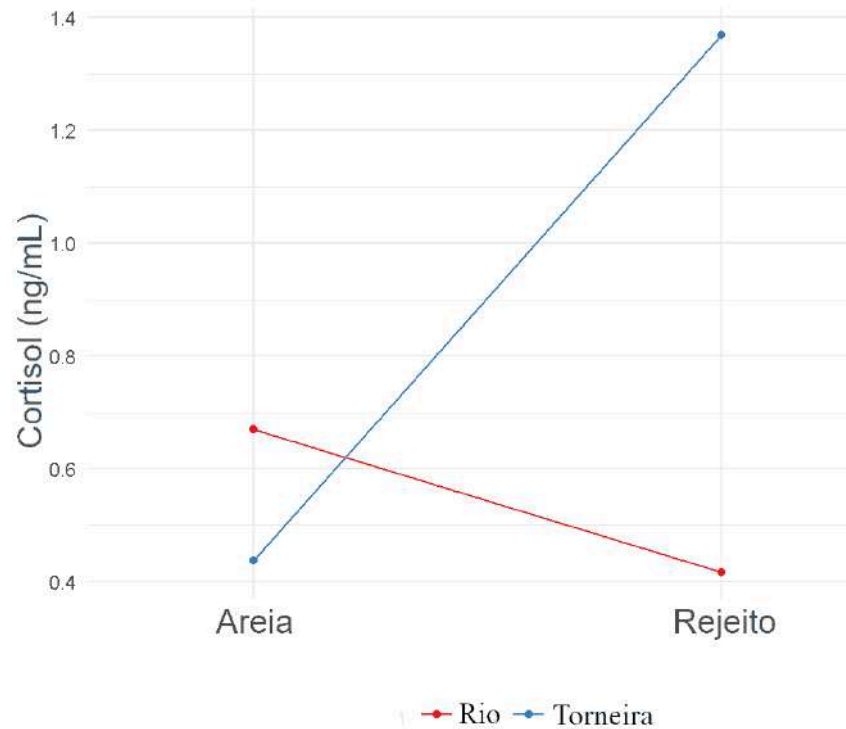


FIGURA 10. O gráfico ilustra os efeitos da interação água-substrato. Os peixes na água do rio mantiveram níveis consistentes de cortisol independente do substrato ($p = 0,14$), enquanto aqueles em água tratada exibiram um aumento significativo de cortisol na presença do rejeito ($p < 0,001$).

3.5. Estresse Oxidativo

3.5.1. Brânquias

Nas brânquias, houve aumento significativo nos níveis de PC ($F_{2,26} = 14,95$; $p < 0,0001$) e uma redução nos níveis de NO ($F_{2,26} = 7,39$; $p = 0,003$) nos tratamentos TR e RR, como indicado na Tabela 4. Para a atividade da catalase, foi observada diferença significativa entre os grupos ($F_{3,25} = 3,13$; $p = 0,04$), com o tratamento RR apresentando os menores níveis da enzima. Por outro lado, as atividades da SOD e GST não apresentaram diferença significativa quando comparados os grupos tratados ao controle ($p = 0,46$ e $p = 0,10$; respectivamente).

Tabela 4. Concentrações de proteína carbonilada “PC” (nmol/mL), óxido nítrico “NO” (µmol/L), catalase “CAT” (U/mg de proteína), superóxido dismutase “SOD” (U/mg de proteína) e glutathione s-transferase “GST” (µmol/min/mL) em brânquias de *Astyanax lacustris* nos diferentes tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).

Brânquias	TA	RA	TR	RR
PC	2.89 ± 0.43 (a)	2.53 ± 0.40 (a)	5.68 ± 0.56 (b)	7.96 ± 1.37 (c)
NO	7.35 ± 0.73 (b)	8.74 ± 0.93 (b)	5.71 ± 0.28 (a)	5.43 ± 0.52 (a)
CAT	2.04 ± 0.15 (ab)	1.71 ± 0.16 (ab)	2.11 ± 0.13 (a)	1.60 ± 0.12 (b)
SOD	0.43 ± 0.03 (a)	0.45 ± 0.05 (a)	0.39 ± 0.02 (a)	0.39 ± 0.03 (a)
GST	3.24 ± 0.36 (a)	2.91 ± 0.18 (a)	3.70 ± 0.40 (a)	2.66 ± 0.20 (a)

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos tratados (água do rio e areia -RA, água de torneira e rejeito-TR e água do rio e rejeito -RR) em comparação com o grupo controle (TA).

Ao analisar as interações água-substrato, foi observada uma interação significativa apenas do substrato nas concentrações de PC (Figura 11-A), sugerindo que a exposição aos rejeitos leva a um aumento desses biomarcadores ($F_{1,27} = 23,45$; $p < 0,001$). Por outro lado, os níveis de NO (Figura 11-B) foram mais acentuados e apresentaram uma interação significativa apenas com o substrato controle ($F_{1,27} = 15,19$; $p < 0,0005$). Para a atividade da catalase (Figura 11-C), foi identificado uma interação significativa com os tratamentos que continham água de torneira em sua composição ($F_{1,27} = 9,59$; $p = 0,004$).

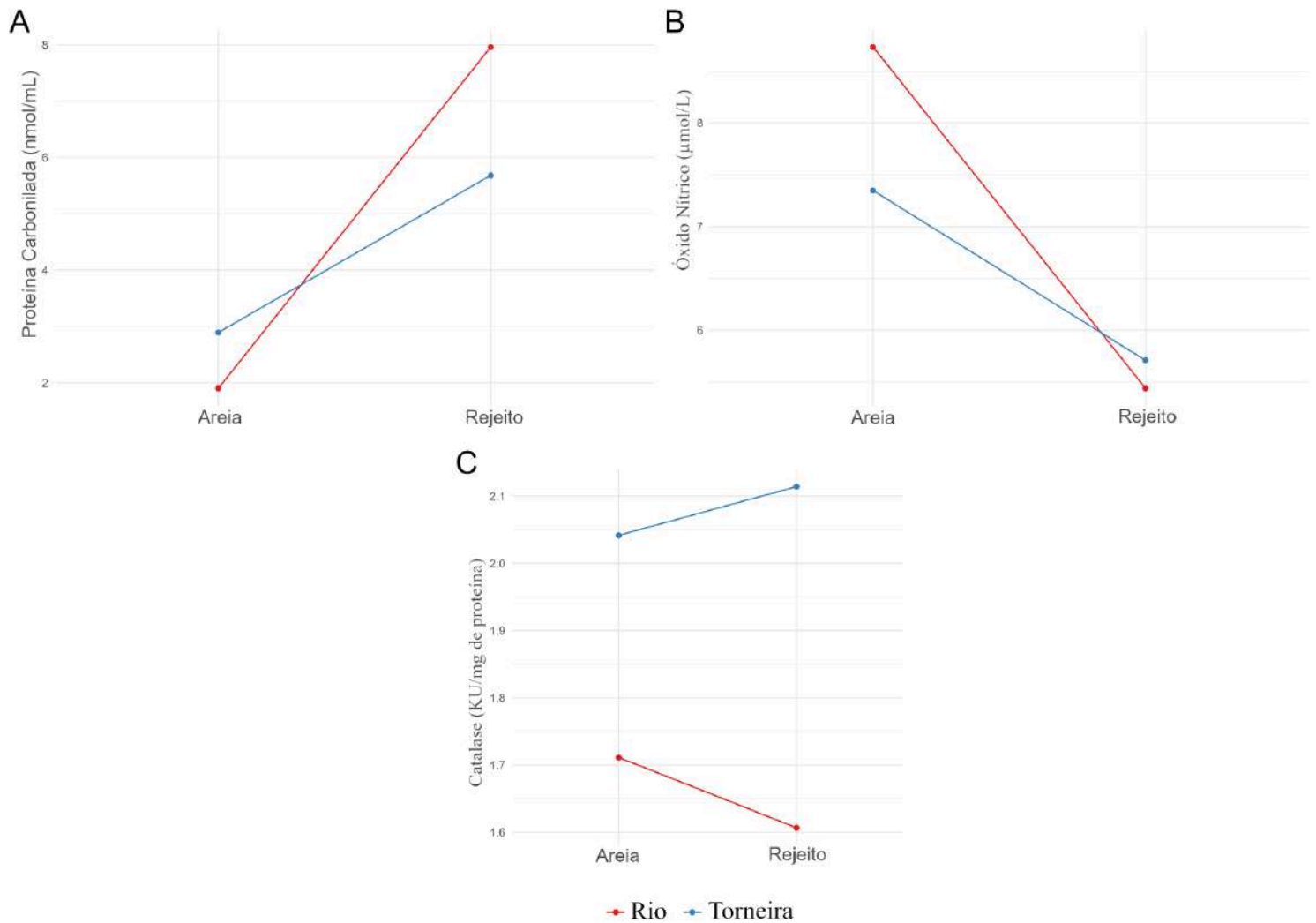


FIGURA 11. Os gráficos ilustram a interação água-substrato para as concentrações de proteínas carboniladas, óxido nítrico e catalase. **A)** Interação do substrato nas concentrações de proteína carbonilada (nmol/mL). O substrato de rejeito apresentou níveis de proteína carbonilada significativamente mais altos em comparação ao substrato de areia, indicando aumento do estresse oxidativo em tecidos expostos ao rejeito. **B)** Interação do substrato nas concentrações de óxido nítrico (µmol/L). O substrato de areia apresentou concentrações mais altas em comparação ao substrato de rejeito. **C)** Interação da água na concentração da catalase (KU/mg de proteína). A água tratada exibiu maior atividade enzimática em comparação à água do rio, sugerindo uma resposta antioxidante aprimorada sob condições de água tratada.

3.5.2. Fígado

No fígado, foram detectados níveis elevados de MDA ($F_{2,22} = 12,74$; $p=0,0002$) e NO ($F_{2,22} = 3,64$; $p=0,04$) comparado ao grupo controle, como indicado na Tabela 5. Enquanto os níveis de CAT ($p=0,34$), SOD ($p=0,52$), PC ($p=0,15$) e GST ($p=0,57$) não apresentaram diferenças significativas quando comparados os grupos tratados ao controle.

Tabela 5. Concentrações de proteína carbonilada “PC” (nmol/mL), óxido nítrico “NO” ($\mu\text{mol/L}$), catalase “CAT” (KU), superóxido dismutase “SOD” (U/mg de proteína), glutathione s-transferase “GST” ($\mu\text{mol/min/mL}$) e malondialdeído “MDA” ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína) em fígados de *Astyanax lacustris* nos diferentes tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).

Fígado	TA	RA	TR	RR
PC	3.00 \pm 0.52 (a)	1.72 \pm 0.63 (a)	1.71 \pm 0.12 (a)	1.97 \pm 0.43 (a)
NO	12.54 \pm 1.78 (a)	21.02 \pm 5.18 (b)	19.43 \pm 1.86 (b)	23.32 \pm 2.07 (b)
CAT	1.19 \pm 0.11 (a)	1.19 \pm 0.09 (a)	1.41 \pm 0.08 (a)	1.30 \pm 0.05 (a)
SOD	0.25 \pm 0.02 (a)	0.26 \pm 0.03 (a)	0.22 \pm 0.01 (a)	0.22 \pm 0.01 (a)
GST	6.26 \pm 0.74 (a)	6.57 \pm 0.72 (a)	6.62 \pm 0.38 (a)	5.37 \pm 0.77 (a)
MDA	0.11 \pm 0.04 (a)	0.31 \pm 0.04 (b)	0.20 \pm 0.02 (a)	0.19 \pm 0.01 (a)

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos tratados (água do rio e areia -RA, água de torneira e rejeito-TR e água do rio e rejeito -RR) em comparação com o grupo controle (TA).

Foi detectada uma interação significativa da água nos níveis de óxido nítrico ($F_{1,23} = 4,53$; $p = 0,04$), com a água do rio apresentando maior influência em seus níveis. Em contraste, a interação água-substrato para as concentrações de malondialdeído indicou um aumento nos peixes mantidos em água tratada com associação ao rejeito ($F_{1,12} = 5,00$; $p = 0,04$), mas diminuiu nos tratamentos com água do rio sob a mesma condição ($F_{1,10} = 7,27$; $p = 0,02$).

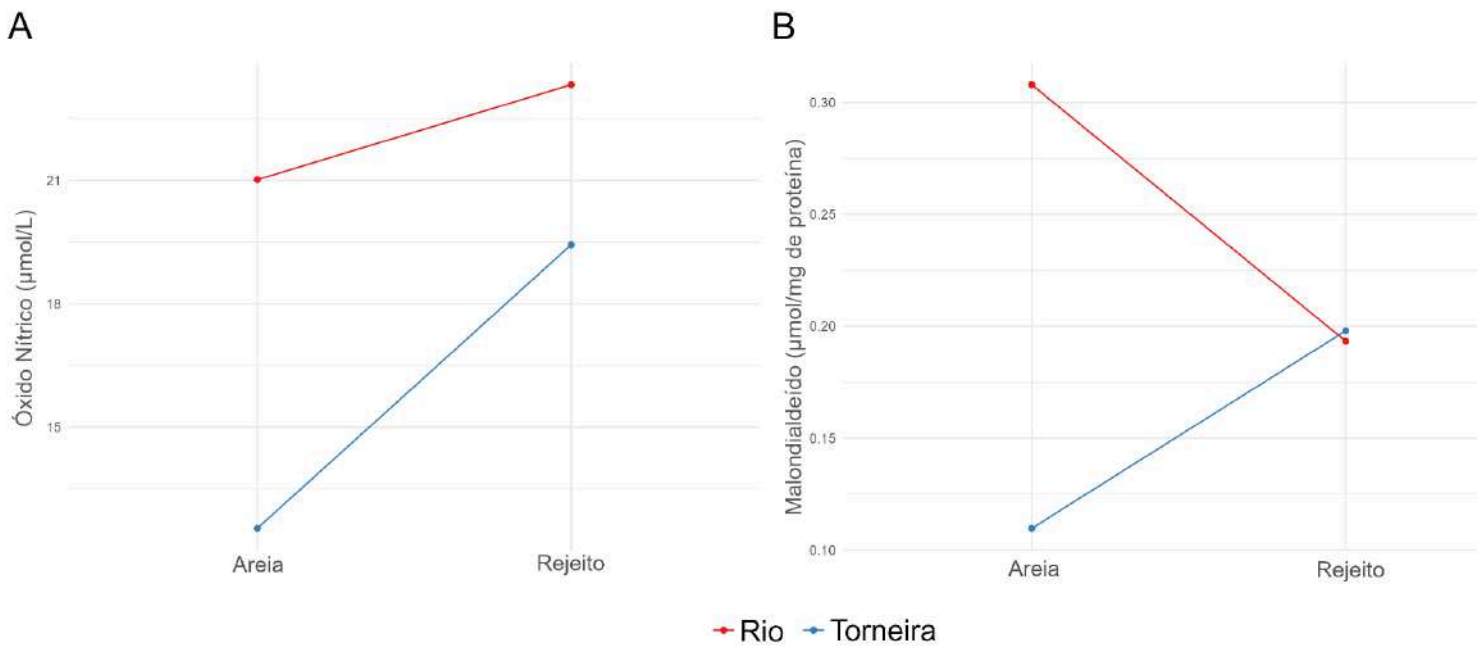


FIGURA 12. Ambos os gráficos ilustram os efeitos da interação água-substrato para óxido nítrico ($\mu\text{mol/L}$) e malondialdeído ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína). Para o óxido nítrico, a água do rio apresentou concentrações maiores em comparação à água de torneira, demonstrando um efeito dependente da água em sua produção. Já os níveis de malondialdeído nos tratamentos do rio diminuíram na presença de rejeitos, enquanto nos tratamentos com a água de torneira, o malondialdeído aumentou sob a mesma condição.

3.5.3. Testículo

Nos testículos, foi observado aumento significativo nos níveis de óxido nítrico ($F_{3,28} = 13,1$, $p < 0,001$), malondialdeído ($F_{2,28} = 6,29$, $p = 0,006$), e na atividade da glutathione s-transferase ($F_{3,28} = 9,29$, $p = 0,0002$) para os três tratamentos em comparação ao grupo controle, indicando estresse oxidativo e resposta antioxidante. As atividades das enzimas Catalase ($p = 0,35$) e da Superóxido Dismutase ($p = 0,51$) não foram significativas.

Tabela 6. Concentrações de óxido nítrico “NO” ($\mu\text{mol/L}$), catalase “CAT” (U/mg de proteína), superóxido dismutase “SOD” (U/mg de proteína) e glutathione s-transferase “GST” ($\mu\text{mol/min/mL}$) em testículos de *Astyanax lacustris* nos diferentes tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).

Testículos	TA	RA	TR	RR
NO	2.20 ± 0.70 (a)	8.65 ± 1.09 (b)	9.69 ± 0.94 (b)	8.19 ± 1.11 (b)
CAT	1.05 ± 0.08 (a)	0.89 ± 0.04 (a)	1.00 ± 0.07 (a)	0.92 ± 0.05 (a)
SOD	0.13 ± 0.02 (a)	0.12 ± 0.01 (a)	0.13 ± 0.01 (a)	0.13 ± 0.01 (a)
GST	5.30 ± 0.77 (a)	10.89 ± 0.84 (b)	10.50 ± 1.12 (b)	11.19 ± 1.16 (b)
MDA	0.238 ± 0.27 (a)	0.177 ± 0.12 (a)	0.148 ± 0.12 (a)	0.064 ± 0.02 (b)

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos tratados (água do rio e areia -RA, água de torneira e rejeito-TR e água do rio e rejeito -RR) em comparação com o grupo controle (TA).

Foi observada uma interação água-substrato significativa na atividade da GST (Figura 13 - B), sugerindo um aumento em seus níveis ($F_{1,14} = 16,4$; $p = 0,001$) nos peixes mantidos em água tratada associada ao rejeito, enquanto que em água do rio nenhum efeito significativo foi detectado ($p = 0,83$). Da mesma forma, os níveis de óxido nítrico (Figura 13 - A) apresentaram um aumento significativo na associação de água tratada e rejeito ($F_{1,14} = 45,6$; $p < 0,0001$), enquanto em água do rio, os níveis permaneceram inalterados ($p = 0,77$).

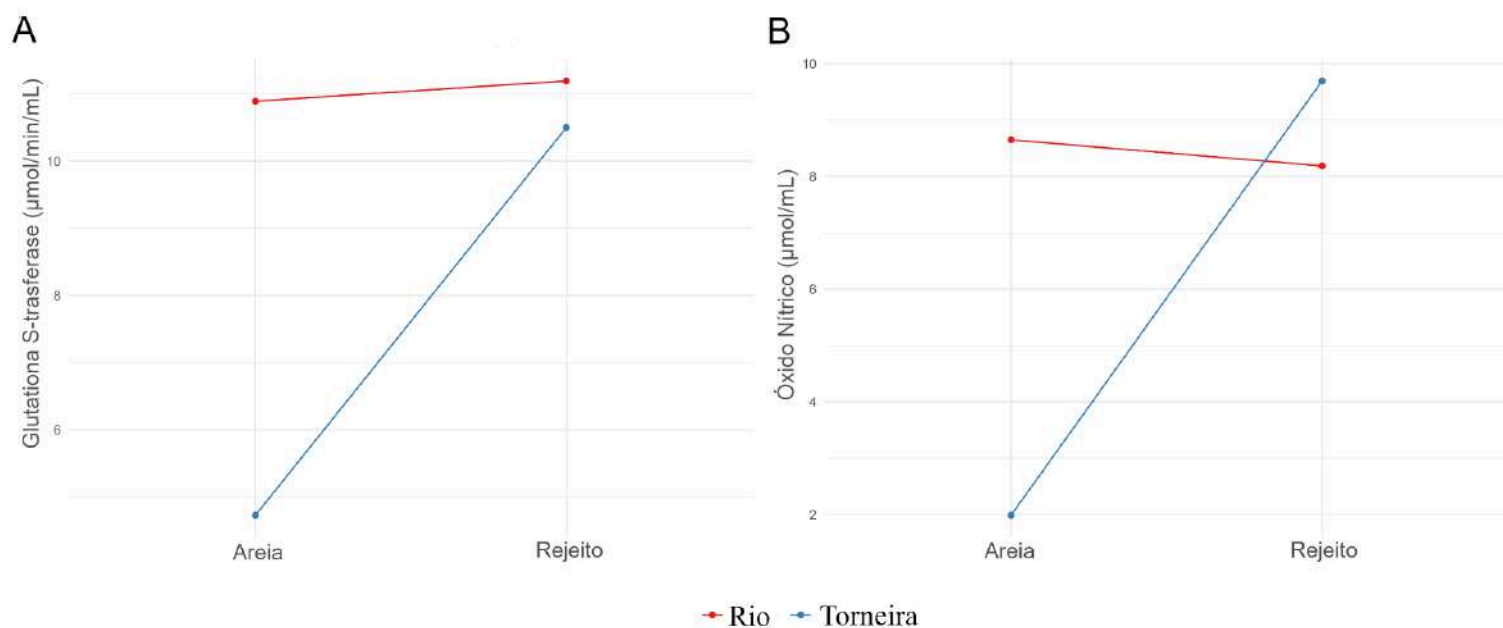


FIGURA 13. Ambos os gráficos ilustram os efeitos da interação água-substrato para óxido nítrico e glutathione S-transferase. Os peixes em água do rio mantiveram níveis consistentes de óxido nítrico e glutathione independentemente do substrato ($p = 0,77$ e $p = 0,83$, respectivamente), enquanto aqueles em água de torneira exibiram um aumento significativo da GST e NO quando em associação com o rejeito ($p < 0,001$ e $p = 0,0012$, respectivamente).

3.6. Análise de Água

Dos 36 metais analisados, apenas 15 foram identificados nas amostras, e entre estes, apenas 7 apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, sendo eles: bário ($F_{2,17} = 10,43$; $p = 0,001$), cobre ($F_{1,10} = 8,85$; $p = 0,01$), enxofre ($F_{3,16} = 15,87$; $p < 0,001$), fósforo ($F_{3,16} = 103,21$; $p < 0,001$), magnésio ($F_{3,16} = 18,76$; $p < 0,001$), potássio ($F_{3,16} = 34,11$; $p < 0,001$) e sódio ($F_{3,15} = 6,47$; $p = 0,005$).

Tabela 7. Concentrações em (mg/L) dos elementos: alumínio (Al), bário (Ba), cálcio (Ca), cobre (Cu), enxofre (S), estrôncio (Sr), ferro (Fe), fósforo (P), magnésio (Mg), manganês (Mn), potássio (K), sílica (SiO₂), silício (Si), sódio (Na) e zinco (Zn) nos diferentes tratamentos - controle (TA), água do rio e areia (RA), água de torneira e rejeito (TR) e água do rio e rejeito (RR).

Metais	TA	RA	TR	RR
Al	0.04 ± 0.02 (a)	0.04 ± 0.01 (a)	0.03 ± 0.008 (a)	0.04 ± 0.002 (a)
Ba	0.07 ± 0.004 (a)	0.07 ± 0.004 (a)	0.06 ± 0.004 (b)	0.05 ± 0.003 (b)
Ca	17.04 ± 1.26 (a)	16.26 ± 0.63 (a)	16.26 ± 1.06 (a)	14.96 ± 0.72 (a)
Cu	0.011 ± 0.002 (a)	0.009 ± 0.001(a)	0.006 ± 0.001 (b)	0.007 ± 0.001 (b)
S	4.20 ± 0.17 (a)	3.13 ± 0.08 (b)	4.49 ± 0.24 (a)	3.41 ± 0.12 (b)
Sr	0.09 ± 0.004 (a)	0.06 ± 0.003 (a)	0.09 ± 0.003 (a)	0.07 ± 0.004 (a)
Fe	0.02 ± 0.004 (a)	0.02 ± 0.001 (a)	0.02 ± 0.007 (a)	0.02 ± 0.004 (a)
P	3.31 ± 0.21(a)	2.81 ± 0.10 (a)	0.84 ± 0.108 (b)	0.02 ± 0.081(b)
Mg	2.77 ± 0.16 (a)	3.96 ± 0.18 (b)	4.11 ± 0.23 (b)	4.53 ± 0.11 (b)
Mn	0.07 ± 0.010 (a)	0.04 ± 0.005 (a)	0.06 ± 0.032 (a)	0.03 ± 0.009 (a)
K	2.67 ± 0.11 (a)	1.80 ± 0.06(b)	3.87 ± 0.20(c)	3.07 ± 0.17(a)

SiO ₂	5.34 ± 1.51 (a)	5.27 ± 1.71 (a)	5.91 ± 2.12 (a)	6.41 ± 1.78 (a)
Si	2.50 ± 0.70 (a)	2.46 ± 0.80 (a)	2.76 ± 1 (a)	2.99 ± 0.83 (a)
Na	20.00 ± 1.96 (a)	12.84 ± 2.04 (a)	21.50 ± 2.54 (a)	10.49 ± 1.18 (b)
Zn	0.05 ± 0.005 (a)	0.04 ± 0.007 (a)	0.01 ± 0.001 (a)	0.03 ± 0.019 (a)

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos tratados (água do rio e areia -RA, água de torneira e rejeito-TR e água do rio e rejeito -RR) em comparação com o grupo controle (TA).

4. DISCUSSÃO

Os resultados indicam que, embora a mortalidade de peixes não tenha sido significativamente diferente entre os tratamentos isolados, quando avaliados pelo tipo de substrato, o rejeito teve um efeito significativo ao longo do tempo de exposição. O declínio na taxa de sobrevivência após o vigésimo dia sugere que a exposição prolongada ao rejeito pode estar afetando negativamente a saúde dos peixes sobreviventes. Leis & Fox (1994), observaram um aumento na mortalidade de ovos de *Stizostedion vitreum* in situ (81%) em comparação ao grupo controle (69%) no rio Ontário (Canadá), contaminado por rejeitos de mineração após um vazamento em 1990. A mortalidade dos ovos foi associada principalmente com as concentrações elevadas de chumbo e cobre. Farag *et al.* (2003) relataram aumento da mortalidade de populações de trutas ao longo do rio Boulder em Montana (EUA) associadas ao aumento dos níveis de cobre, cádmio, arsênio, zinco e chumbo. Essa região é conhecida por receber drenagem de galerias de minas abandonadas e escoamento de rejeitos de mineração antigos. Hansen *et al.* (2002) observaram um aumento da mortalidade de trutas-touro (*Salvelinus confluentus*) expostas cronicamente ao cobre (7.1%) comparado com o grupo controle (2.3%), mesmo quando os demais parâmetros de toxicidade indicaram que ela é mais resistente à efeitos tóxicos quando comparada com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Esses estudos reforçam o impacto negativo que os metais possuem nas taxas de sobrevivência das populações de peixes, nas diferentes condições de sensibilidade das espécies.

A bacia do Rio Doce é considerada um *hotspot* prioritário para a conservação mundial devido a sua alta riqueza de espécies, endemismo e elevado grau de ameaça (Myers *et al.*, 2000). Estima-se que a bacia abriga aproximadamente 80 espécies de peixes nativas, sendo 13 delas endêmicas da região (Viana, 2017), e aproximadamente 40 espécies exóticas (BUENO *et al.*, 2021). Dentre as espécies nativas, cerca de 9 espécies são

classificadas como vulneráveis, ameaçadas ou criticamente ameaçadas (COSTA *et al.*, 2025; MMA, 2022; ICNU 2024). Mesmo que moderado, esse declínio na sobrevivência pode representar um risco para espécies vulneráveis na bacia, principalmente em condições de exposição crônica. Além disso, o rompimento da barragem levou a um aumento na abundância de espécies exóticas e nativas generalistas (SALVADOR *et al.*, 2022), intensificando a competição com as demais espécies e aumentando sua vulnerabilidade.

O menor ganho no peso e a diferença no comprimento corporal dos alevinos expostos tanto ao rejeito quanto à água do rio reforça um dos principais efeitos da contaminação histórica do Rio Doce no crescimento da ictiofauna. Duarte *et al.* (2021) encontraram níveis elevados de arsênio e cádmio em amostras de água antes e após o desastre de Mariana, indicando que a poluição da bacia por metais pesados ocorre de forma contínua devido à atividade mineradora da região, sendo intensificada após o desastre.

A ausência de um efeito significativo do rejeito no peso dos peixes mantidos na água do rio pode indicar uma interação antagonista de neutralização entre as duas variáveis. Essa interação pode estar ligada a fatores naturais no rio que modulam ou reduzem os efeitos adversos do rejeito. Por exemplo, Gomes *et al.* (2021) relataram que a cianobactéria *Synechococcus elongatus* e a alga *Chlorococcum infusionum* encontradas no Rio Doce podem metabolizar e reduzir as concentrações de ferro e manganês em 53% e 79% respectivamente, ao longo de 96 horas, desempenhando um papel crucial na biorremediação de poluentes na bacia. Além disso, as concentrações de cobre, cádmio e chumbo na água do rio, ambas encontradas antes e depois do desastre, podem ter tido suas concentrações reduzidas devido à sua alta afinidade pela goethita e argila presentes no rejeito (CHRISTOPHI & AXE, 2000; PIRES *et al.*, 2003). Essa interação explicaria a ausência de efeito sinérgico entre a água do rio e o rejeito, como também observado nas concentrações de metais e metalóides em análises de água por Gomes *et al.* (2019).

Entretanto, os resultados para comprimento corporal mostram um efeito diferente em comparação ao peso. Enquanto o rejeito reduziu o comprimento dos peixes em água tratada, sua presença na água do rio foi associada a um aumento significativo. Esse resultado pode ser explicado por um mecanismo compensatório, através do qual os peixes ajustam suas estratégias de crescimento em resposta a condições ambientais adversas (HORNICK, 2000; HERRERA *et al.* 2016). Em ambientes contaminados, é possível que os organismos priorizem o aumento do comprimento como uma estratégia para melhorar a absorção de oxigênio ou reduzir a absorção de toxinas, em detrimento do ganho de peso.

A análise hormonal revelou mudanças significativas nos níveis de cortisol, com um

aumento acentuado no tratamento TR em comparação aos outros tratamentos. Como um indicador primário de estresse em peixes, o cortisol é produzido em resposta a estressores ambientais, sugerindo que a exposição ao rejeito pode ter induzido uma resposta crônica ao estresse (ADORNO *et al.*, 2023; ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2024). Essa elevação no cortisol pode prejudicar a fisiologia do peixe, afetando as funções metabólicas e imunológicas, bem como influenciando o comportamento e a reprodução.

Por outro lado, os hormônios T3 e GH não apresentaram mudanças significativas entre os grupos experimentais, sugerindo que, nas condições deste estudo, esses hormônios não foram diretamente impactados pela exposição aos rejeitos ou à água do Rio Doce. A ausência de níveis detectáveis de T4 e testosterona em análises laboratoriais pode indicar que suas concentrações estavam abaixo dos limites de detecção para os métodos utilizados de extração hormonal dos pedúnculos .

Nas brânquias, os níveis de proteínas carboniladas (PC) foram mais elevados nos grupos com substrato de rejeito, um resultado consistente com Vieira *et al.* (2022), que relataram achados semelhantes em peixes da Bacia do Rio Doce após o rompimento da barragem. O acúmulo de proteínas carboniladas está ligado a processos inflamatórios e respostas autoimunes, contribuindo para danos celulares e fisiológicos significativos (FEDOROVA *et al.*, 2013; BAGNYUKOVA *et al.*, 2006).

A redução da atividade da catalase nas brânquias nos tratamentos RA e RR sugere um comprometimento das defesas antioxidantes contra o estresse oxidativo induzido pela contaminação. Resultados semelhantes foram relatados por Ha *et al.* (2021) que identificaram reduções das concentrações da catalase em exposição crônica ao cádmio após 30 dias na tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Atli *et al.* (2006) também observaram a diminuição dos níveis de CAT nas brânquias da tilápia-do-nilo em exposição ao cobre e cromo. Conforme relatado por Lushchak, (2016), a atividade da CAT e da GST tende a aumentar em resposta à presença de poluentes ambientais. Entretanto, a exposição prolongada a poluentes pode levar à sobrecarga das defesas celulares, levando a uma redução funcional da enzima e, conseqüentemente, da capacidade antioxidante (BAGNYUKOVA *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2016). Assim, a diminuição dos níveis de CAT pode ser indicativa de exaustão enzimática, fenômeno comum na exposição crônica a poluentes, onde a produção contínua de ROS excede a capacidade de resposta do sistema antioxidante.

Os níveis de NO nas brânquias foram significativamente influenciados pelo tipo de substrato utilizado. Peixes mantidos em substratos de resíduos de mineração apresentaram

níveis reduzidos de NO quando comparados aos expostos a substratos de areia. Essa redução pode estar relacionada à formação de peroxinitrito (ONOO•), resultantes da interação entre NO e O₂• (PIERINI & BRYAN, 2014). Essas espécies são altamente tóxicas e podem comprometer ainda mais a integridade celular em tecidos diretamente expostos a contaminantes ambientais (XIA *et al.*, 2006). Com base nesses dados, acredita-se que a redução dos níveis de NO seja consequência de sua interação com O₂•, levando à formação de ONOO•.

Os achados do estresse oxidativo reforçam os achados histológicos para as brânquias, visto que o aumento nos níveis de proteína carbonilada indicam a insuficiência das defesas antioxidantes em lidar com as EROs. O aumento observado nas alterações histopatológicas nos grupos tratados em comparação ao grupo controle sugere que, embora nenhuma falha funcional grave tenha sido detectada, a exposição crônica ao rejeito e à água do Rio Doce representa um risco significativo à saúde dos peixes. Essas alterações podem comprometer a eficiência da osmorregulação, respiração, e demais parâmetros necessários para a sobrevivência dos indivíduos. Como identificado por Fonseca *et al.* (2016), estressores ambientais causados por atividades antropogênicas alteram a morfologia das brânquias, como o levantamento do epitélio lamelar, fusão lamelar e vasodilatação, consistentes com os achados deste estudo. Kumar *et al.* (2016) também identificaram os mesmos danos histopatológicos em *Oreochromis mossambicus* coletados do rio Bhima (Índia) que é extensivamente contaminado por metais pesados.

No fígado, o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) indica excesso de radicais livres e a incapacidade do sistema antioxidante de metabolização. Segundo Choudhury e Saha (2016), o aumento da produção de NO está relacionado a uma maior formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), indicando uma possível resposta de estresse oxidativo à presença de contaminantes. Além disso, como observado por Sanchez *et al.* (2005) que avaliou concentrações de enzimas antioxidantes no fígado de peixes expostos ao cobre, os níveis de SOD e CAT tendem a aumentar nos primeiros dias de exposição e posteriormente retornar ao seu estado basal, o que pode explicar a ausência de achados significativos no nosso estudo.

A atividade da enzima SOD não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tecidos analisados. Há uma tendência de aumento de enzimas antioxidantes em peixes expostos a metais, sugerindo um mecanismo compensatório para lidar com altos níveis de ROS (BIRNIE-GAUVIN *et al.* 2017; SHAHJAHAN *et al.*, 2022; PASCHOALINI e BAZZOLI, 2021). Essa resposta é amplamente relatada na literatura, destacando o papel

essencial da SOD na neutralização do superóxido ($O_2\bullet$) e da catalase (CAT) na quebra de H_2O_2 em água e oxigênio. Weber *et al.* (2020) determinaram os níveis de SOD em duas espécies de peixes nativos in situ da bacia do Rio Doce. Semelhante ao que foi encontrado neste estudo, nenhuma alteração nos níveis de SOD foi observada em *Hypostomus affinis*. Assim, a ausência de alterações significativas na atividade da SOD sugere que essa via de defesa não consegue controlar adequadamente os níveis de radicais livres, permitindo o acúmulo de EROs e possivelmente levando a danos oxidativos nas células.

Como observado por Poleksic *et al.* (2010), o fígado do esturjão *Acipenser ruthenus* apresentou alterações patológicas como fibrose, infiltrados leucocitários, congestão dos sinusóides e vasodilatação na presença de metais pesados. Alterações histopatológicas se diferem entre os tecidos (Bernet *et al.*, 1999), porém há uma tendência de maior incidência no fígado devido a natureza detoxificadora do órgão, o que reforça os achados do presente estudo. Os achados de Fátima & Usmani (2013) corroboram os resultados deste estudo, visto que o fígado de duas espécies de peixes (*Channa striatus* e *Heteropneustes fossilis*) apresentaram núcleos picnóticos, vacuolização, ruptura de veias e hemorragia quando expostos à níquel, cromo e chumbo.

No testículo, podemos observar um equilíbrio fisiológico eficiente entre a produção da glutathione s-transferase (GST) e óxido nítrico (NO), destacando a relevância das GSTs na detoxificação de xenobióticos (IGHODARO e AKINLOYE, 2018; TORRES, SOARES e MAIA, 2004). A ausência de danos histológicos nos testículos reforça os achados de estresse oxidativo, em que as atividades enzimáticas do órgão foram suficientes para neutralizar a ação das EROs.

A ausência de metais-chave como chumbo, cádmio e arsênio nas amostras de água analisadas neste estudo pode ser atribuída à sua bioacumulação nos músculos dos peixes. Com o tempo, a exposição a esses contaminantes permite sua remoção temporária da coluna d'água, explicando sua ausência em nossas amostras (LEE *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2022). Passos *et al.* (2020) relataram a presença de altas concentrações de Fe e Mn no estuário do Rio Doce, observando bioacumulação de Fe e Mn no fígado e nas brânquias de *Astyanax lacustris*. Esse acúmulo pode interferir na regulação iônica, na respiração celular e resultar na produção descontrolada de EROs.

Uma descoberta intrigante foi a diminuição da biodisponibilidade do fósforo (P), um elemento essencial para a manutenção metabólica, nos tratamentos que continham o rejeito na sua composição. Barbieri *et al.* (2013) descobriram que o conteúdo de argila está positivamente correlacionado com a adsorção de fósforo, o que significa que maiores

concentrações de argila resultam em maior retenção de fósforo. Isso sugere que a argila presente na lama do rejeito desempenhou um papel crucial na redução da disponibilidade de fósforo ao ligar íons de fosfato (PO_4^{3-}) por meio de interações eletrostáticas ou complexação com óxidos de ferro e alumínio presentes na fração de argila. Consequentemente, o fósforo era menos propenso à lixiviação, limitando sua acessibilidade a plantas e outros organismos.

O fósforo é um importante componente metabólico, constituindo os ácidos nucleicos, membranas celulares e está ligado diretamente na produção de energia através das moléculas de ATP (KREISBERG, 1977). Na maioria dos vertebrados, a deficiência de fósforo resulta na degeneração óssea, visto que para continuar o crescimento mesmo com a baixa ingestão de P na dieta, os animais metabolizam o fosfato de cálcio estocados nos ossos (SUGIURA *et al.*, 2004), retendo o P e eliminando Ca no processo. Essa mobilização afeta diretamente o crescimento dos peixes, reduzindo seu crescimento e apresentando efeitos clínicos como letargia, anorexia e coloração escura caso os níveis de P caiam abaixo do nível limite (SUGIURA *et al.*, 2004), o que pode explicar a diminuição do ganho de peso neste estudo.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a exposição ao rejeito resultante do rompimento da barragem de mineração na Bacia do Rio Doce causou um aumento na mortalidade de peixes. Os animais expostos ao rejeito também apresentaram uma diminuição no crescimento, outro fator que pode comprometer a saúde e a sobrevivência a longo prazo dos animais. A falta de interação significativa entre os fatores "água" e "substrato" sugere que os contaminantes na água do Rio Doce e no rejeito de mineração agem de forma independente, sem potencializar os efeitos tóxicos um do outro. Em termos de estresse oxidativo, foram encontradas alterações significativas na concentração de proteínas carboniladas nas brânquias e malondialdeído no fígado, o que ressalta o impacto severo da contaminação por metais pesados. A atividade reduzida da catalase nas brânquias dos peixes expostos à água do Rio Doce reforça ainda mais a ideia de defesas antioxidantes prejudicadas. Embora o dano histopatológico tenha sido, em geral, de leve a moderado, a exposição crônica ao rejeito pode levar à disfunção dos tecidos, impactando negativamente a sobrevivência a longo prazo e favorecendo espécies mais resilientes. A diminuição da biodisponibilidade do fósforo na presença do rejeito pode indicar o principal fator de alterações fisiológicas nos indivíduos neste estudo. Por fim, é fundamental a realização de estudos ecotoxicológicos de longo prazo que avaliem não apenas

os efeitos agudos, mas também os impactos subletais e crônicos da exposição ao rejeito sobre diferentes níveis de organização biológica, incluindo biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e populacionais. Essas informações são essenciais para embasar ações de mitigação, recuperação ambiental e a formulação de políticas públicas voltadas à conservação da ictiofauna da Bacia do Rio Doce.

6. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit.** 2004 Jun;10(6):RA141-7. Epub 2004 Jun 1. PMID: 15173684.

ABDEL-TAWWAB, M., Elabd, H., Mahboub, H.H. *et al.* The protective efficacy of dual dietary rosemary plus cinnamon mix against lead nitrate-induced immune suppression, genotoxicity, and oxidant/antioxidant status in Nile tilapia fingerlings. **Aquacult Int** 32, 4009–4029 (2024). <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10499-023-01362-7>

ADAMS, S. M., Giesy, J. P., Tremblay, L. A., & Eason, C. T. (2001). The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. **Biomarkers**, 6(1), 1–6. doi:10.1080/135475001452724

ADORNO, H. A., Souza, I. D. C., Monferrán, M. V., Wunderlin, D. A., Fernandes, M. N., & Monteiro, D. A. (2023). A multi-biomarker approach to assess the sublethal effects of settleable atmospheric particulate matter from an industrial area on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science of The Total Environment**, 856, 159168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>

ANA - Agência Nacional das Águas. Encarte Especial sobre a Bacia do rio Doce: rompimento da barragem em Mariana/MG. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil, informe 2015**. Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos - SPR, Agência Nacional de Águas, Brasília, 2016. 49 p.

ATLI, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., & Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 143(2), 218–224. doi:10.1016/j.cbpc.2006.02.003

AVMA - American Veterinary Medical Association. Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 2020. Available from: <https://www.avma.org>

AYALA, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014, 360438. doi:10.1155/2014/360438

BAGNYUKOVA, T. V.; *et al.* Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 4, p. 325-331, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>.

BALALI-MOOD, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., & Khazdair, M. R. (2021). Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. **Frontiers in Pharmacology**, 12, 643972. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972

- BERNET D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 22:25–34.
- BIRNIE-GAUVIN, Kim *et al.* A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. **Fish And Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928-942, 2017. Wiley. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/faf.12215>.
- Bose-O'Reilly, S., Yabe, J., Makumba, J., Schutzmeier, P., Ericson, B., & Caravanos, J. (2018). Lead intoxicated children in Kabwe, Zambia. **Environmental Research**, 165, 420–424. doi:10.1016/j.envres.2017.10.024
- BUEGE, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. **Biomembranes - Part C: Biological Oxidations**, 302–310. doi:10.1016/s0076-6879(78)52032-6
- BUENO, M. L., Magalhães, A. L. B., Andrade Neto, F. R., Alves, C. B. M., Rosa, D. M., Junqueira, N. T., Pessali, T. C., Pompeu, P. S., & Zenni, R.D. (2021). Alien fish fauna of southeastern Brazil: Species status, introduction pathways, distribution and impacts. **Biological Invasions**, 23, 3021–3034. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02564-x>
- CARMO, F. F., Kamino, L. H. Y., Junior, R. T., Campos, I. C., Carmo, F. F., Silvano, G., da Silva Xavier de Castro, K. J., Mauro, M. L., Rodrigues, N. U. A., de Souza Miranda, M. P., & Pinto, C. E. F. (2017). Fundão tailings dam failures: The environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 15, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.06.002>.
- CARRASCO, J. A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M. A., López, R., ... Palomares, A. J. (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. **Soil Biology and Biochemistry**, 37(6), 1131–1140. doi:10.1016/j.soilbio.2004.11.015
- CARVALHO, Marllon Santos de et al. Concentration of metals in the Doce river in Mariana, Minas Gerais, Brazil. **Acta Brasiliensis**, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 37-41, sep. 2017. ISSN 2526-4338. Available at: <<http://www.revistas.ufcg.edu.br/actabra/index.php/actabra/article/view/58>>. Date accessed: 21 feb. 2025. doi: <https://doi.org/10.22571/Actabra13201758>.
- CARVAN, M. J. (2007). Fish Models in Toxicology. *Zebrafish*, 4(1), 9–20. doi:10.1089/zeb.2006.9998
- CHOUDHURY, Mahua G.; SAHA, Nirmalendu. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by Lipopolysaccharide and the Influences of Cell Volume Changes, Stress Hormones and Oxidative Stress on Nitric Oxide Efflux from the Perfused Liver of Air-Breathing Catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 1-21, 7 mar. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150469>.
- CHOWDHURY, R, Ramond A, O'Keefe L M, Shahzad S, Kunutsor S K, Muka T et al. Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis **BMJ** 2018; 362 :k3310 doi:10.1136/bmj.k3310
- CHRISTOPHI, C.A. and AXE, L., 2014. Competition of Cd, Cu and Pb adsorption on goethite. *Journal of Environmental Engineering*, vol. 126, no. 1, pp. 66-74. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2000\)126:1\(66\)](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:1(66)).

COSTA, Elisabeth Henschel De Lima. Registros de espécies ameaçadas da bacia do rio doce na coleção ictiológica do mzufv e sua importância para a conservação. **Anais do EBI - Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campina Grande: Realize Editora, 2025. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/119543>>. Acesso em: 16/06/2025 14:06

COSTA, Patrícia Gomes *et al.* Temporal and spatial variations in metals and arsenic contamination in water, sediment and biota of freshwater, marine and coastal environments after the Fundão dam failure. **Science Of The Total Environment**, v. 806, p. 1-23, 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151340>.

DESTRO, Ana Luiza F.; SILVA, Stella B.; GREGÓRIO, Kemilli P.; OLIVEIRA, Jerusa M. de; LOZI, Amanda A.; ZUANON, Jener Alexandre S.; SALARO, Ana Lúcia; MATTA, Sérgio Luís P. da; GONÇALVES, Reggiani V.; FREITAS, Mariella B.. Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 208, p. 111601, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111601>.

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, 33–39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>.

DROGE, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, 82(1), 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001

DUARTE, Eduardo Baudson *et al.* Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere**, v. 262, p. 127879, jan. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>.

ESCOBAR, H. (2015). Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. **Science**, 350, 1138–1139. <https://doi.org/10.1126/science.350.6265.1138>.

FATIMA, M., & Usmani, N. (2013). Histopathology and bioaccumulation of heavy metals (Cr, Ni and Pb) in fish (*Channa striatus* and *Heteropneustes fossilis*) tissue: A study for toxicity and ecological impacts. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 16(9), 412–420. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.412.420>

FEDOROVA, Maria *et al.* Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 2, p. 79-97, 7 jul. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/mas.21381>.

FERNANDES, D., Zanuy, S., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008. Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. **Environ. Pollut.** 152, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.05.012>.

FERNANDES GW, Goulart FF, Ranieri BD, Coelho MS, Dales K, Boesche N, Bustamante M, Carvalho FA, Carvalho DC, Dirzo R *et al.* 2016. Deep into the mud: Ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. **Natureza & Conservação** 14(2):35–45.

FERREIRA, F. F., de Freitas, M. B. D., Szinwelski, N., Vicente, N., Medeiros, L. C. C., Schaefer, C. E. G. R., Dergam, J. A., & Sperber, C. F. (2020). Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. **bioRxiv**. <https://doi.org/10.1101/2020.05.09.086058>

FONSECA, A. R.; SANCHES FERNANDES, L. F.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, S. M.; PACHECO, F. A. L. From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. **Science of the Total Environment**, v. 550, p. 972-986, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.199>.

FREITAS, Rodrigo Barros *et al.* Euterpe edulis Extract but Not Oil Enhances Antioxidant Defenses and Protects against Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by a High-Fat Diet in Rats. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 1-9, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8173876>.

GABRIEL, Fabrício Â.; Ferreira, Amanda D.; QueirozZ, Hermano M.; Vasconcelos, Ana Luisa S.; Ferreira, Tiago O.; Bernadino, Angelo F. Long-term contamination of the Rio Doce estuary as a result of Brazil's largest environmental disaster. **Perspectives In Ecology And Conservation**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 417-428, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecon.2021.09.001>.

GOMES, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Miranda, T. O., Pereira, T. M., Merçon, J., Davel, V. C., Barbosa, B. V., Pereira, A. C. H., Frossard, A., & Ramos, J. P. L. (2019). Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 79(4), 659–664. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188086>

GOMES, M. P., Kochi, L. Y., Freitas, P. L., Figueredo, C. C., & Juneau, P. (2021). Periphytic Algae and Cyanobacteria from the Rio Doce Basin Respond Differently to Metals and Salinity, Showing Different Potential for Bioremediation. **Plants**, 10(11), 2349. <https://doi.org/10.3390/plants10112349>

GUEST, T.W., Blaylock, R.B., Evans, A.N., 2016. Development of a modified cortisol extraction procedure for intermediately sized fish not amenable to whole-body or plasma extraction methods. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0111-4>.

HA, L., Hoa, B., & Dau, P. (2021). Effect of Heavy Metals on the Activity of Catalase and Glutathione-S-Transferase in Nile Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*). **VNU Journal Of Science: Natural Sciences And Technology**, 37(4). doi:10.25073/2588-1140/vnunst.5339

HABIG, W.H., Pabst, M.J., William, B., 1974. Glutathione s- transferases 25, 7130–7139. *J. Biol.Chem.* 249 (22) (25), 7130–7139.

HADWAN, M. H., & Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data in Brief**, 6, 194–199. doi:10.1016/j.dib.2015.12.012

HANSEN, J. A., Welsh, P. G., Lipton, J., & Cacela, D. (2002). Effects of Copper Exposure on Growth and Survival of Juvenile Bull Trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, 131(4), 690–697. doi:10.1577/1548-

HATJE, V., Pedreira, R. M. A., Rezende, C. E., Schettini, C. A. F., Souza, G. C., Marin, D. C., & Hackspacher, P. C. (2017). The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports**, 7, 10706. doi:10.1038/s41598-017-11143-x

He, B., Wang, W., Geng, R., Ding, Z., Luo, D., Qiu, J., ... Fan, Q. (2021). Exploring the fate of heavy metals from mining and smelting activities in soil-crop system in Baiyin, NW China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 207, 111234. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111234

HERRERA, Leandro Amaral; SILVA, Francisco da Costa; SANTOS, Ana Paula dos; SOUSA, Otávio Mesquita de; SANCHES, Eduardo Gomes. Crescimento compensatório e privação alimentar no desempenho produtivo do robalo-flecha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 6, p. xxxx-xxxx, jun. 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X201600060000x>.

HORNICK, J. L.; VAN EENAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. **Domesticated Animal Endocrinology**, v. 19, n. 2, p. 121-132, ago. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(00)00072-2).

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal Of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

IUCN- International Union for Conservation of Nature. (2020). The IUCN Red List of Threatened Species: Version 2020-3. Retrieved February 20, 2025, from <https://www.iucnredlist.org/>

JANSEN, EHJM, Beekhof PK, Cremers JWJM, Viezelien D, Muzakova V, Skalick J. Short-term stability of biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in human serum. **ISRN Biomarkers**. 2013;2013:316528. doi: 10.1155/2013/316528.

JAISHANKAR, Monisha, et al. "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals" **Interdisciplinary Toxicology**, vol. 7, no. 2, Slovak Academy of Sciences, 2014, pp. 60-72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>

KARNOVSKY, M. J. (1965). "A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy." **The Journal of Cell Biology**, 27(2), 137A–138A.

Kotov, V., & Nikitina, E. (1996). Norilsk Nickel: Russia Wrestles with an Old Polluter. **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**, 38(9), 6–37. doi:10.1080/00139157.1996.9930998

KREISBERG, R. A. (1977). Phosphorus Deficiency and Hypophosphatemia. **Hospital Practice**, 12(3), 121–128. doi:10.1080/21548331.1977.11707099

KUMAR, N., Krishnani, K. K., Gupta, S. K., & Singh, N. P. (2017). Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 49, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.017>

LEIS, A. L., & Fox, M. G. (1994). Effect of mine tailings on the in situ survival of walleye (*Stizostedion vitreum*) eggs in a northern Ontario river. **Écoscience**, 1(3), 215–222. doi:10.1080/11956860.1994.1168224

LEE, Ju-Wook *et al.* Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: a review. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 68, p. 101-108, 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.010>.

- LEVINE, R.L., Willians, J.A., Stadtman, E.R., Schacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 233, 257–346. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33040-9)
- LICÍNIO, M. V. V. J., Leão, R. T., Gaudereto, F. G., Costa-Gonçalves, A., Patchneelan, S. R., Vidal, M. da Silva M., Carneiro, M. T. W. D., Freitas, A. C., Evangelista, H. da S., Ribeiro, J. N., Pereira, M. G., & Ribeiro, A. V. F. N. (2016). Tendências históricas das taxas de sedimentação e acúmulo de elementos traço no baixo curso do Rio Doce, Espírito Santo, Brasil. **Cadernos De Geociências**, 12(1-2), 13–24. Recuperado de <https://revbaianaenferm.ufba.br/index.php/cadgeoc/article/view/13060>
- LIMA, F.C.T., L.R. Malabarba, P.A. Buckup, J.F. Pezzi da Silva, R.P. Vari, A. Harold, R. Benine, O.T. Oyakawa, C.S. Pavanelli, N.A. Menezes, C.A.S. Lucena, M.C.S.L. Malabarba, Z.M.S. Lucena, R.E. Reis, F. Langeani, C. Moreira et al. ..., 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-168. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- LIMÓN-PACHECO, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 674(1-2), 137–147. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.01
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265–275.
- LU, Siyu; WEI, Fang; LI, Guolin. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. **Cell Stress**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 76-85, 14 jun. 2021. Shared Science Publishers OG. <http://dx.doi.org/10.15698/cst2021.06.250>.
- LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology And Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711-747, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>.
- LUSHCHAK, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. **EXCLI Journal**, 20, 956–967. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>
- MARCON, L.; Bazzoli, N.; Mounteer, A.H.; Benjamin, L.A. 2015. Histological and histometric evaluation of the liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: characidae), exposed to different concentrations of an organochlorine insecticide. **Anatomical Record**, 298, 1754-1764.
- MARCON, L., Lopes, D. S., Mounteer, A. H., Goulart, A. M. A., Leandro, M. V., & Dos Anjos Benjamin, L. 2016. Pathological and histometric analysis of the gills of female *Hyphessobrycon* eues (Teleostei: Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilin®. **Ecotoxicology and environmental safety**, 131, 135-142.
- MEDEIROS, A. O. *et al.* Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1582-1594, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822012000400043>.
- MENON SV, Kumar A, Middha SK, Paital B, Mathur S, Johnson R, Kademan A, Usha T, Hemavathi KN, Dayal S, Ramalingam N, Subramaniyam U, Sahoo DK and Asthana M (2023),

Water physicochemical factors and oxidative stress physiology in fish, a review. **Front. Environ. Sci.** 11:1240813. doi: 10.3389/fenvs.2023.1240813

Milanez, B., Ali, S. H., & Puppim de Oliveira, J. A. (2021). Mapping industrial disaster recovery: Lessons from mining dam failures in Brazil. **The Extractive Industries and Society**, 8(2), 100900. doi:10.1016/j.exis.2021.100900

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. *Portaria nº 45, de 17 de fevereiro de 2022*. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 fev. 2022. Seção 1, p. 14-22.

MONAGHAN, Pat; Metcalfe, Neil B.; TorreS, Roxana. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letters**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 75-92, 9 dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>.

MOURÃO, A.O.; *et al.* Assessment of Health Risk and Presence of Metals in Water and Fish Samples from Doce River, Brazil, After Fundão Dam Collapse. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 84, n. 3, p. 377-388, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-023-00991-6>.

Myers, N., Mittermeier, R. a, Mittermeier, C. G. da Fonseca, G. a, & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403 (6772), 853 – 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706275>

OLIVEIRA, Claudia; Camilo, Björn. Entrevistas e análise de metais pesados ao longo do rio Doce. *Geochimica Brasiliensis*, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 394-406, 23 fev. 2020. **Geochimica Brasiliensis**. <http://dx.doi.org/10.21715/gb2358-2812.2019334394>.

PARK, K., Han, E. J., Ahn, G., & Kwak, I.-S. (2020). Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, 105479. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105479

PASCHOALINI, A. L.; BAZZOLI, N. Heavy metals affecting Neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. **Aquatic Toxicology**, v. 237, n. 105906, p. 1-11, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105906>.

PASCHOALINI, A.L.; Savassi, L.A.; Arantes, F.P.; Rizzo, E., Bazzoli, N. 2019. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. **Ecotoxicology and Environmenta**. Safety, 169, 539-550

PASSOS, Larissa Souza *et al.* Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: characidae) three years after the samarco mining dam collapse?. **Science Of The Total Environment**, v. 736, p. 139644, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>.

PETER, M. C. Subhash, *et al.*. Inducible Nitric Oxide Synthase/Nitric Oxide System as a Biomarker for Stress and Ease Response in Fish: implication on na⁺ homeostasis during hypoxia. **Frontiers In Physiology**, v. 13, p. 1-14, 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.821300>.

PETRUCIO, M. M., Medeiros, A. O., Rosa, C. A., & Barbosa, F. A. R. (2005). Trophic state and microorganisms community of major sub-basins of the middle Rio Doce Basin, Southeast Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4), 625–633.

PIERINI, Dan; BRYAN, Nathan S. Nitric Oxide Availability as a Marker of Oxidative Stress.

Methods In Molecular Biology, p. 63-71, 2014. doi:
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8_5.

PIRES, J.M.M., Lena, J.C., Machado, C.C., Pereira, R.S., 2003. Polluting potential of Samarco Mineração S.A. solid waste: a Germano dam case study. *Revista Árvore* 27 (3), 393–397p.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000300017>.

PIRH (2010) Plano integrado de recursos hídricos da bacia do rio Doce e dos planos de ações de recursos hídricos para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce. Volume I—relatório final. Consórcio ECOPLAN— LUME, Brazil, p 478

POLEKSIC, V., Lenhardt, M., Jarić, I., Djordjević, D., Gačić, Z., Cvijanović, G., & Rašković, B. (2010). Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 29(3), 515–521.
<https://doi.org/10.1002/etc.82>

POLEKSIC, V.; Mitrovic-Tutundzic, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, 339-352.

POSIT team (2024). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.

RIBEIRO, S. M. R., Queiroz, J. H. de, Peluzio, M. C. G., Costa, N. M. B., Da Matta, S. L. P., & Queiroz, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. (2006). **Bioscience Journal**, 21(3).
<https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617>

SALARO, AL, Campello DAB, Tavares MM, Braga LG, Pontes MD, Zuanon JAS. Transport of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 in saline water. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 2015 Apr-Jun;37(2):137-42. doi: 10.4025/actasciobiolsci.v37i2.26884.

SALVADOR, G. N., Montag, L. F. A., Hughes, R. M., Almeida, S. M., Prudente, B. S., Pessali, T. C., Barroso, T. A., Cianciaruso, M. V., Ligeiro, R., Juen, L., & Carlucci, M. B. (2022). Influences of multiple anthropogenic disturbances coupled with a tailings dam rupture on spatiotemporal variation in fish assemblages of a tropical river. **Freshwater Biology**, 67(11), 1833–1847.
<https://doi.org/10.1111/fwb.13967>

SANCHEZ, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., & Aït-Aïssa, S. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19(1), 177–183. doi:10.1016/j.etap.2004.07.003

SEGURA, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú.L., Pedreira Filho, W., dos, R., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F.F., Batista, B.L., 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environ. Pollut.** 218, 813-825.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>

SHAHJAHAN, Md *et al.* Effects of heavy metals on fish physiology – A review. **Chemosphere**, v. 300, p. 134519, 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134519>.

SHARMA, Arvind Kumar; SHARMA, Munish; SHARMA, Simran; MALIK, Davendra Singh; SHARMA, Munit; SHARMA, Munish; SHARMA, Amit Kumar. A systematic review on

assessment of heavy metals toxicity in freshwater fish species: current scenario and remedial approaches. **Journal Of Geochemical Exploration**, [S.L.], v. 262, p. 107472, jul. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2024.107472>.

SIWIK, P. L., Van Meer, T., MacKinnon, M. D., & Paszkowski, C. A. (2000). Growth of fathead minnows in oil-sand-processed wastewater in laboratory and field. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19(7), 1837–1845. doi:10.1002/etc.5620190718

SPOSITO, J.C.V., Francisco, L F V, Crispim, BA, Dantas, FGS, Souza, JP, Viana, LF, Solórzano, JCJ, Oliveira, KMP, Barufatti, A, 2019. Influence of Land Use and Cover on Toxicogenetic Potential of Surface Water from Central-West Brazilian Rivers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 76, 483-495

STIERLE, A. A., & Stierle, D. B. (2013). Bioprospecting in the Berkeley Pit. **Studies in Natural Products Chemistry**, 1–45. doi:10.1016/b978-0-444-62615-8.00001-1

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. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.0

SUGIURA, S. H., Hardy, R. W., & Roberts, R. J. (2004). The pathology of phosphorus deficiency in fish - a review. **Journal of Fish Diseases**, 27(5), 255–265. doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00527.x

TORRES, Maria Célia Lopes; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; MAIA, June Ferreira. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243-248, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612004000200014>.

VALKO, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39(1), 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

VERMONT, A.; Petit-Härtlein, I.; Smith, S.M.E.; Fieschi, F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. **Antioxidants** 2021, 10, 890 DOI: 10.3390/antiox10060890

VIANA J. P. (2017). Os pescadores da bacia do Rio Doce: subsídios para a mitigação dos impactos socioambientais do desastre da Samarco em Mariana, Minas Gerais. *Boletim regional, urbano e ambiental*, (16), 1 – 51. <http://www.ipea.gov.br>

VIEIRA, C. E. D. *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**, v. 832, n. 154878, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>.

WEBER, André Alberto *et al.* Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: a case study of the fundão dam, Brazil. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 190, p. 110165, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>.

XIA, Zhengyuan *et al.* Antioxidant N-acetylcysteine restores systemic nitric oxide availability and corrects depressions in arterial blood pressure and heart rate in diabetic rats. **Free Radical**

Research, v. 40, n. 2, p. 175-184, 2006. <http://dx.doi.org/10.1080/10715760500484336>.