

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**EMMILY BILÓ BAPTISTA RIBEIRO DEBONA**

**ALTERAÇÕES EM BRÂNQUIAS DE ALEVINOS DE *Astyanax lacustris*  
EXPOSTOS AO REJEITO DA BACIA DO RIO DOCE**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2025**

**EMMILY BILÓ BAPTISTA RIBEIRO DEBONA**

**ALTERAÇÕES EM BRÂNQUIAS DE ALEVINOS DE *Astyanax lacustris*  
EXPOSTOS AO REJEITO DA BACIA DO RIO DOCE**

Monografia, apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**


**2025**

**EMMILY BILÓ BAPTISTA RIBEIRO DEBONA**

**ALTERAÇÕES EM BRÂNQUIAS DE ALEVINOS DE *Astyanax lacustris* EXPOSTOS AO REJEITO DA BACIA DO RIO DOCE**


Monografia, apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

APROVADA: 30 de janeiro de 2025

Documento assinado digitalmente  
 **EMMILY BILO BAPTISTA RIBEIRO DEBONA**  
Data: 03/02/2025 19:54:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Emmily Biló Baptista Ribeiro Debona  
(Autor)

Documento assinado digitalmente  
 **MARIELLA BONTEMPO DUCA DE FREITAS**  
Data: 03/02/2025 20:13:07-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Mariella Bontempo Duca de Freitas  
(Orientadora)  
Departamento de Biologia Animal - UFV

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, aos amigos e à Morena, por todo o apoio e motivação ao longo da minha jornada.

À minha orientadora, Mariella, e aos membros da banca, Pedro Henrique e Jener Alexandre, pela orientação, confiança e apoio.

À FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq pelo fomento a esta pesquisa.

## RESUMO

O rompimento da barragem de Fundão, em 2015, resultou na liberação de milhões de toneladas de rejeitos de mineração na Bacia do Rio Doce, acarretando impactos ambientais severos e colocando em risco a biota aquática. Este estudo avaliou os efeitos do rejeito sobre as brânquias de alevinos de *Astyanax lacustris* em marcadores de estresse oxidativo. Alevinos (N=500) foram distribuídos em quatro tratamentos, ao longo de 35 dias, variando a proveniência da água (água tratada ou do Rio Doce) e composição do substrato (areia ou rejeito de mineração), sendo eles: água tratada-areia (AT-R), água do rio-areia (AR-A), água tratada-rejeito (AT-R) e água do rio-rejeito (AR-R). Brânquias foram coletadas e analisadas para avaliação dos teores de óxido nítrico (NO) e proteínas carboniladas (PC) e atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST). A atividade da SOD não destacou diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo não compensação de EROs. A redução da atividade das enzimas CAT e GST em peixes expostos à água do Rio Doce indica um comprometimento das defesas antioxidantes devido à sobrecarga celular causada pelos poluentes. Os peixes expostos ao rejeito de mineração apresentaram níveis reduzidos de óxido nítrico (ON) e aumentados de proteínas carboniladas (PC), sugerindo a formação de peroxinitrito e danos celulares. Portanto, a exposição ao rejeito de mineração induziu estresse oxidativo em *Astyanax lacustris*, afetando o equilíbrio redox e indicando estresse oxidativo crônico.

**Palavras-chave:** ecotoxicologia; poluentes aquáticos; rejeito de minério; desastre ambiental.

## ABSTRACT

The collapse of the Fundão dam in 2015 resulted in the release of millions of tons of mining tailings into the Doce River Basin, causing severe environmental impacts and putting aquatic biota at risk. This study evaluated the effects of tailings on the gills of *Astyanax lacustris* fry in terms of oxidative stress markers. Fry (N=500) were allocated to four treatments over 35 days, varying the source of the water (treated water or the Rio Doce) and the composition of the substrate (sand or mining tailings): treated water-sand (AT-R), river water-sand (AR-A), treated water-tailings (AT-R) and river water-tailings (AR-R). Gills were collected and analyzed for nitric oxide (NO) and carbonylated protein (CP) levels and the activities of the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST). SOD activity showed no significant differences between the treatments, suggesting no compensation for ROS. The reduction in the activity of the CAT and GST enzymes in fish exposed to water from the Rio Doce indicates an impairment of antioxidant defenses due to the cellular overload caused by the pollutants. Fish exposed to mining tailings showed reduced levels of nitric oxide (NO) and increased levels of carbonylated proteins (CP), suggesting the formation of peroxynitrite and cell damage. Therefore, exposure to mining tailings induced oxidative stress in *Astyanax lacustris*, affecting the redox balance and indicating chronic oxidative stress.

**Keywords:** ecotoxicology; water pollutants; ore tailings; environmental disaster.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. Rejeitos de mineração.....	8
2.2. Metais.....	9
2.3. Estresse oxidativo em pesquisas com metais.....	10
3. Objetivo.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. METODOLOGIA.....	13
4.1. Animais e ensaio experimental.....	13
4.1.1. Preparação da água e substrato.....	14
4.1.2. Design experimental.....	14
4.2. Eutanásia.....	16
4.3. Análises de estresse oxidativo.....	16
4.3.1. Superóxido Dismutase (SOD).....	17
4.3.2. Atividade da catalase (CAT).....	17
4.3.3. Óxido nítrico (ON).....	17
4.3.4. Atividade da glutathione S-transferase (GST).....	17
4.3.5. Oxidação de proteínas (PC).....	18
4.3.6. Proteínas totais (PT).....	18
4.4. Análise estatística.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Estresse oxidativo de brânquias.....	19
6. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Foto de parte dos aquários com lambaris-do-rabo-amarelo durante a exposição aos tratamentos com areia como substrato.....	15
FIGURA 2: Foto de parte dos aquários com lambaris-do-rabo-amarelo durante a exposição aos tratamentos com rejeito de mineração como substrato.....	16
FIGURA 3: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n = 8$ para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.....	19
FIGURA 4: Atividade da enzima catalase (CAT). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n = 8$ para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.....	20
FIGURA 5: Níveis de glutathione-S-transferase (GST). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n = 8$ para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.....	21
FIGURA 6: Níveis de óxido nítrico (ON). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n = 8$ para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.....	22
FIGURA 7: Níveis de proteína carbonilada (PC). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n = 8$ para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.....	23

## 1. INTRODUÇÃO

A bacia hidrográfica do Rio Doce é uma importante área de drenagem localizada na região sudeste do Brasil, abrangendo aproximadamente 86.000 km<sup>2</sup>, com seu percurso atravessando os estados de Minas Gerais e Espírito Santo (MOURÃO, 2023). Este rio é considerado um ponto-chave para diversas atividades hídricas na região, desempenhando um papel crucial na socioeconomia dos dois estados, já que fornece a água necessária para usos domésticos, agropecuários, industriais e de mineração, além de ser fundamental para a geração de energia elétrica (COSTA *et al.*, 2022).

O colapso da barragem da mineradora Samarco, ocorrido em 5 de novembro de 2015, foi considerado o pior desastre ambiental da história do Brasil. O rompimento da barragem "Fundão", localizada no município de Mariana-MG, resultou na liberação de aproximadamente 50 milhões de toneladas de lama e rejeito de mineração de ferro no meio ambiente (ANA, 2016). Esse evento gerou consequências devastadoras, impactando irreversivelmente os ecossistemas, os processos ecológicos e as comunidades que dependem dos recursos do Rio Doce. Especialmente na fauna aquática, foram observadas diminuições na diversidade de peixes, bioacumulação de metais, além de alterações bioquímicas e estresse oxidativo. (FERNANDES *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2020; PASSOS *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2022).

Antes do desastre, o Rio Doce já enfrentava níveis preocupantes de poluição devido a diversos fatores, incluindo mineração, agricultura e o desperdício inadequado de resíduos industriais e esgoto urbano (MEDEIROS *et al.*, 2012). Particularmente, diferentes metais e metaloides, como arsênio, cobalto, bário e níquel, já estavam presentes na região (DUARTE *et al.*, 2021). Ainda, o lançamento de lama e efluentes de mineração ao longo do rio, decorrente do rompimento da barragem, ocasionou a movimentação e ressuspensão dos contaminantes que se encontram sedimentados no substrato. Desse modo, o desastre agravou a situação da bacia do Rio Doce, intensificando a liberação de metais e outros poluentes ao longo do curso do rio, afetando diretamente a vida aquática e as comunidades locais.

Nesse contexto, os peixes têm sido amplamente reconhecidos como indicadores biológicos no monitoramento da contaminação em ambientes aquáticos. Sua ampla distribuição geográfica, presença em diversos níveis tróficos, capacidade de bioacumulação de substâncias tóxicas e sensibilidade a contaminantes os tornam especialmente adequados para esse propósito (PASCHOALINI *et al.*, 2019). Nos últimos anos, espécies do gênero *Astyanax* têm sido amplamente empregadas como organismos-modelo em pesquisas que investigam os efeitos de diversos contaminantes, incluindo metais (SANTOS *et al.*, 2012; MACÊDO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

De acordo com Terán *et al.* (2020), diversas espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* eram difíceis de ser identificadas com precisão, sendo comumente identificadas em complexo de espécies, como o grupo *Astyanax bimaculatus*. *Astyanax lacustris*, popularmente conhecido como lambari-de-rabo-amarelo, é uma espécie pertencente à família Characidae, amplamente distribuída nas Américas Central e do Sul. Esta foi originalmente descrita por Lütken em 1875 como *Tetragonopterus lacustris*, com base em espécimes coletados na Lagoa Santa, na bacia do rio São Francisco. Ao longo dos anos, a taxonomia desta espécie passou por várias revisões, em que nomes como *Astyanax jacuhiensis*, *Astyanax asuncionensis* e *Astyanax altiparanae* foram considerados sinônimos de *A. lacustris*. Ainda, essa espécie já foi incluída no complexo *Astyanax bimaculatus*, identificada como *Astyanax bimaculatus paraguayensis* e *Astyanax bimaculatus asuncionensis* (LUCENA e SOARES, 2016). Devido à sua alta sensibilidade a mudanças ambientais, como poluição, contaminação e doenças, *A. lacustris* tem sido frequentemente utilizado em estudos de ecotoxicidade (NIMET *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2012). Esta espécie possui um sistema imunológico bem desenvolvido e é facilmente manejada em laboratório, o que a torna um modelo adequado para pesquisas com ecotoxicidade. Além disso, estes peixes são amplamente encontrados nas bacias hidrográficas do Brasil, como o Rio Doce (ORSI *et al.*, 2004), e possuem relevância econômica, uma vez que podem atuar como fonte de alimento através de sua reprodução em cativeiro e comercialização (CAMPELO *et al.*, 2018).

Devido à sua elevada persistência e baixa biodegradabilidade, os metais induzem toxicidade em peixes através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da desregulação dos sistemas de defesa antioxidante. Metais com potencial redox como ferro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr) e níquel (Ni), geram EROs através de ciclos redox e reações de Fenton, produzindo ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). Metais sem atividade redox, como mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e cádmio (Cd), comprometem as defesas antioxidantes ao se ligarem a grupos tiol de moléculas como a glutatona (GSH) e enzimas dependentes de tiol, inibindo sua função e levando ao acúmulo de ROS (PASCHOALINI e BAZZOLI, 2021; SEVCIKOVA *et al.*, 2011).

Em resposta a essa exposição, os peixes apresentam alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares, que podem ser utilizadas como biomarcadores para o monitoramento de contaminantes em ambientes aquáticos (SHAHJAHAN *et al.*, 2022). Considerando a importância alimentar e econômica dos peixes, é crucial estudar os efeitos dos poluentes nesses organismos, dado que os contaminantes acumulados nesses organismos podem ser transferidos ao ser humano por meio da cadeia alimentar, representando um risco potencial à saúde pública (AMQAM *et al.*, 2020; HAJRIC *et al.*, 2022 ; HOQUE *et al.*, 2022). Ainda, pesquisas sobre o impacto de rejeitos de mineração em

espécies neotropicais nativas são escassas. Portanto, diante do colapso da barragem de Fundão, as análises de estresse oxidativo surgem como ferramentas promissoras para avaliar os efeitos do rejeito de mineração nesses organismos e, conseqüentemente, os impactos ambientais decorrentes desse desastre.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Rejeitos de mineração

A bacia do Rio Doce, uma das principais regiões hidrográficas do sudeste do Brasil, foi significativamente impactada pelas atividades industriais, agrícolas, urbanas e pelo rompimento da barragem de Fundão em 2015. Esse desastre ambiental liberou aproximadamente 50 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos de mineração, que se espalharam por mais de 650 km, afetando a qualidade da água, sedimentos e ecossistemas associados (IBAMA, 2015). O rejeito era composto por diversos metais, principalmente de ferro, sílica, alumínio, manganês, mercúrio, além de metaloides como arsênio. Estudos apontam que a concentração de metais como alumínio (1.906,71 µg/L), ferro (8.503,50 µg/L), manganês (370,32 µg/L) e mercúrio (34,25 µg/L) na água do Rio Doce superam os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. Além disso, metais como cádmio, chumbo, cobre e zinco também foram detectados em concentrações elevadas, sobretudo nos sedimentos (DUARTE *et al.*, 2021). Mourão *et al.* (2023) e Macêdo *et al.* (2020) observaram altas concentrações de metais, acima dos limites permitidos, como ferro (Fe), alumínio (Al), manganês (Mn), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) no rio Doce, mesmo passados vários anos após o rompimento da barragem. Ademais, os sedimentos atuam como sumidouro poluentes, que podem ser remobilizados por processos naturais, como chuvas, ou por atividades humanas (GARNERO *et al.*, 2018). Assim, a passagem de lama e rejeito de mineração ao longo do Rio Doce mobilizou e ressuspendeu os contaminantes que já haviam se depositado no fundo do rio. Desse modo, os metais e demais poluentes, através da ressuspensão, se tornaram novamente biodisponíveis na coluna d'água (VÄÄNÄNEN *et al.*, 2019; PASSOS *et al.*, 2020).

Antes do rompimento da barragem de Fundão, a qualidade da água da bacia do Rio Doce já era significativamente comprometida por diversas atividades humanas. A bacia, que abrange cerca de 84 mil km<sup>2</sup> nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, sofre com os impactos da urbanização, mineração, agricultura e lançamento de efluentes industriais e domésticos. Essas atividades resultaram em elevada concentração de sedimentos e nutrientes, degradação da vegetação nativa e contaminação por metais, frequentemente

detectados acima dos limites permitidos para consumo humano (DUARTE *et al.*, 2021). Estudos indicam que elementos como ferro, manganês e chumbo eram detectados frequentemente acima dos limites permitidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 (MEDEIROS *et al.*, 2012; ANA, 2016). De acordo com Santolin *et al.* (2015), o cromo apresentou concentrações superiores aos limites aceitáveis em todos os 19 pontos analisados do Rio Doce. Além disso, 10 amostras excederam os níveis permitidos para o cobre, e 8 amostras ultrapassaram os limites de mercúrio. Ademais, um estudo na região identificou que as águas dos rios e lagos da bacia apresentavam altos índices de coliformes fecais, indicando forte contaminação por esgoto doméstico não tratado (MEDEIROS *et al.*, 2012). Apenas 41 dos 209 municípios da bacia possuíam coleta e tratamento de esgoto, com muitos ainda despejando seus resíduos diretamente nos cursos d'água. No aspecto físico-químico, as águas do Rio Doce exibiam variações significativas no pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, especialmente em locais próximos a áreas urbanas e industriais (ANA, 2016).

A presença desses metais em conjunto com outros poluentes, incluindo resíduos industriais e compostos orgânicos, cria um cenário de contaminação multifatorial. Essa interação entre diferentes contaminantes ilustra o conceito de “coquetéis químicos reativos”, onde os efeitos combinados dos poluentes podem ser mais tóxicos do que os efeitos individuais de cada substância. Essas misturas de contaminantes têm potencial para gerar efeitos sinérgicos, mesmo quando os poluentes estão presentes em concentrações consideradas seguras de forma isolada (HEYS *et al.*, 2016; KAUSHAL *et al.*, 2018). No caso do Rio Doce, a presença concomitante de metais e outros xenobióticos em conjunto com o rejeito de mineração pode ter amplificado o impacto nos organismos aquáticos.

## **2.2. Metais**

Os metais são elementos não biodegradáveis, isto é, que apresentam uma longa persistência no ambiente aquático, acumulando-se em sedimentos e organismos vivos ao longo do tempo. A contaminação por metais nos ambientes aquáticos tem se tornado uma preocupação crescente devido ao impacto tanto na saúde dos organismos aquáticos quanto na população humana. O consumo de peixes contaminados é apontado como uma das principais vias de bioacumulação desses contaminantes na população (HOQUE *et al.*, 2022). Vasconcelos *et al.* (2021) analisaram a concentração de mercúrio em músculo de peixes consumidos por uma comunidade indígena amazônica, que se encontra próxima a área de mineração. A avaliação revelou que a ingestão diária de metilmercúrio excede a

dose de referência da USEPA (United States Environmental Protection Agency) de 3 a 25 vezes, indicando que o consumo de peixes não é seguro para essa população.

Além disso, os metais podem penetrar no organismo dos peixes por meio da ingestão de alimentos, da absorção de água ou da troca iônica através de membranas semipermeáveis, acumulando-se posteriormente em diferentes tecidos corporais. Jakimska *et al.* (2011) apontam que a bioacumulação de metais em tecidos depende dos tipos de metais, das espécies de peixes e do metabolismo e mecanismos de detoxificação dos tecidos. Entretanto, Ray e Vashishth (2024) e Garnerio *et al.* (2018) verificaram que há uma maior tendência destes se acumularem em tecidos que participam do processo de excreção de xenobióticos como fígado, rins e brânquias. A exposição e acúmulo de metais no organismo dos peixes influencia as atividades enzimáticas e metabólicas, resultando em distúrbios bioquímicos e morfológicos (SHAHJAHAN *et al.*, 2022). Foram documentados danos patológicos em diferentes níveis, desde alterações bioquímicas e genéticas até lesões teciduais em peixes expostos a metais (BARRAICH e JANGU, 2015; COPPO *et al.*, 2018; SAULIUTĖ *et al.*, 2020). Cazenave *et al.* (2009), Weber *et al.* (2020) Vieira *et al.* (2022) evidenciaram a indução de estresse oxidativo, em tecidos distintos, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes e dos níveis de proteínas carboniladas em peixes expostos a estes xenobióticos. Ademais, Savassi *et al.* (2020) e Fonseca *et al.* (2017) relataram alterações histopatológicas no baço, fígado e brânquias de peixes selvagens expostos a metais como chumbo, cádmio, arsênio e mercúrio. Por fim, foi demonstrado que a exposição de peixes a diferentes metais, como manganês e chumbo, está associada a alterações reprodutivas, como danos histopatológicos nas gônadas (MERÇON *et al.*, 2021) e deformidades nos estágios iniciais dos ovócitos (BARRAICH e JANGU, 2015).

### **2.3. Estresse oxidativo em pesquisas com metais**

Tanto no presente quanto no passado, biomarcadores de estresse oxidativo têm sido amplamente utilizados como ferramentas para explorar os mecanismos redox. Estes são ferramentas cruciais na ecotoxicologia, pois permitem a correlação entre a exposição externa a contaminantes, a bioacumulação nos tecidos e os impactos fisiológicos nos organismos. Assim, os biomarcadores fornecem uma visão abrangente do estado redox de um organismo, capturando informações sobre peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos oxidativos ao DNA (MARGARITELIS *et al.*, 2016; KROON *et al.*, 2017).

Os peixes possuem grande diversidade de tamanhos, morfologias e histórias de vida, que aliados à sua ampla distribuição geográfica, presença em diversos níveis tróficos e alta sensibilidade

à alterações ambientais os tornam modelos ideais para estudos ecotoxicológicos (BIRNIE-GAUVIN *et al.*, 2017; PASCHOALINI e BAZZOLI, 2021).

As brânquias dos peixes desempenham um papel essencial na troca gasosa e estão em constante contato com o ambiente aquático, tornando-se uma das principais vias para a absorção de metais. Além do mais, estas desempenham outras funções fundamentais nos peixes, como a osmorregulação, o equilíbrio ácido-base e a excreção de compostos nitrogenados (SANTOS *et al.*, 2012). Desse modo, sua multifuncionalidade, aliada à ampla área direta de superfície e exposição ao ambiente externo, tornam esse órgão altamente suscetível à toxicidade (THOPHON *et al.*, 2003; PANDEY, 2008).

O estresse oxidativo ocorre quando há o desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidantes, podendo levar à oxidação de macromoléculas, peroxidação lipídica, danos ao DNA, disfunções celulares e morte celular (MACÊDO *et al.*, 2020; PASSOS *et al.*, 2020; SHAHJAHAN *et al.*, 2022). Os metais com potencial redox, como Cr, Cu e Fe, podem induzir a geração de EROS, como os radicais superóxido ( $O_2\bullet$ ) e hidroxila ( $OH\bullet$ ) e compostos não radicais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), através do ciclo redox e reações de Fenton. Ainda, podem ser formadas espécies reativas de nitrogênio, como radical óxido nítrico ( $ON\bullet$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO\bullet$ ), produzido pela reação dos radical superóxido ( $O_2\bullet$ ) e óxido nítrico ( $ON\bullet$ ). Por outro lado, os metais que não possuem atividade redox, como Cd, Pb e Hg, promovem o esgotamento das reservas celulares de sulfidril e prejudicam as defesas antioxidantes e enzimas que contém grupos tiol (LIMA, 2004).

Assim como nos demais animais, os peixes possuem defesas antioxidantes contra toxicidade ocasionada por xenobióticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) (WINSTON e DI GIULIO, 1991). Essas enzimas representam a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, sendo frequentemente analisadas em estudos de estresse oxidativo para avaliar as capacidades antioxidantes dos organismos. Quanto ao mecanismo de ação destas, a SOD converte radicais livres superóxido em peróxido de hidrogênio, que é subsequentemente degradado em oxigênio e água pela CAT. Já a GST participa da desintoxicação ao catalisar a conjugação de eletrófilos com glutathione reduzida (GSH), tornando os contaminantes mais solúveis em água e consequentemente, facilitando sua excreção (LIMA, 2004; BARBOSA *et al.*, 2010; IGHODARO e AKINLOYE, 2018).

Pesquisas realizadas na bacia do Rio Doce após o rompimento da barragem de Fundão, como descrito por Vieira *et al.* (2022), evidenciam a eficácia do uso de biomarcadores para avaliar a saúde de comunidades de peixes expostos a rejeitos de minério. Biomarcadores como danos ao DNA, peroxidação lipídica, danos oxidativos em proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes

como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), foram utilizados para medir os impactos dos rejeitos. Os resultados revelaram alterações bioquímicas associadas à contaminação por metais, com variações sazonais e efeitos persistentes mesmo anos após o desastre. Weber *et al.* (2020) o impacto do rompimento da barragem de Fundão foi avaliado em *Hoplias intermedius* e *Hypostomus affinis*, ambos nativos da bacia do Rio Doce. Enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram níveis elevados em peixes coletados em áreas contaminadas, indicando danos oxidativos associados à exposição a metais. Em outro contexto, biomarcadores de estresse oxidativo foram empregados para analisar a qualidade da água da bacia e níveis de metais do Rio Salado, na Argentina (CAZENAVE *et al.*, 2009). Os resultados mostraram que a atividade GST e os níveis de peroxidação lipídica foram elevados nos tecidos hepáticos de *Prochilodus lineatus*, indicando que esses peixes foram submetidos a condições ambientais.

Além disso, a exposição de organismos aquáticos a misturas complexas de substâncias químicas, tanto de origem natural quanto antropogênica, representa um desafio significativo para a saúde dos ecossistemas aquáticos (KAUSHAL *et al.*, 2018; SALVADOR *et al.*, 2022). Nessa linha, Jijie *et al.* (2020) estudaram a combinação de cádmio (Cd) e níquel (Ni) com deltametrina em peixe-zebra. As atividades de SOD e GPx permaneceram inalteradas após o tratamento com Ni e Cd, mas foram significativamente elevadas após a exposição à deltametrina, o que reforça a importância de considerar as interações entre contaminantes em estudos ecotoxicológicos.

### **3. Objetivo**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos das combinações entre o rejeito de minerais no Rio Doce e a qualidade da água no estresse oxidativo das brânquias em *Astyanax lacustris*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar análises de estresse oxidativo no tecido branquial, a fim de identificar possíveis alterações metabólicas e fisiológicas.
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GST, e os níveis de ON e PC em peixes expostos, comparando-os com os peixes do grupo controle.
- Identificar possíveis correlações entre as alterações observadas e a exposição dos peixes expostos ao rejeito de mineração e água do Rio Doce.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado e está em conformidade com toda a legislação e regulamentos exigidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 071/2024).

#### **4.1. Animais e ensaio experimental**

Os experimentos foram realizados com 500 alevinos da espécie *Astyanax lacustris* adquiridos do criadouro comercial certificado Fazenda Lindóia, da localidade de Teixeira-MG. Os peixes foram transportados em condições controladas até o Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, onde permaneceram em um período de aclimatação de sete dias. Durante esse período, foram alojados em três tanques de 500 litros contendo água desclorada e oxigenada, com aeração constante e temperatura estabilizada em  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . As condições ambientais foram

rigorosamente monitoradas, com valores de oxigênio dissolvido mantidos em torno de 8 µg/mL e pH ajustado entre 7,0 e 7,2. Para a medição da temperatura e do oxigênio dissolvido, foi utilizado um oxímetro digital da marca Traceable® (Texas, EUA). Já o pH foi aferido com um medidor digital da Kasvi® (Paraná, Brasil). Ainda, a iluminação foi controlada para um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Durante o período de aclimatação, os alevinos foram alimentados com uma dieta com 36% de proteína bruta, oferecida três vezes ao dia até a saciedade. Qualquer excesso de alimento foi removido para evitar a deterioração da qualidade da água.

#### **4.1.1. Preparação da água e substrato**

Após o período de aclimatação, os alevinos foram distribuídos em quatro grupos experimentais distintos, variando de acordo com a origem da água (água tratada desclorada e água do Rio Doce) e o tipo de substrato (areia e rejeito de mineração). As amostras de água do Rio Doce e de rejeito de mineração foram coletadas no rio Gualaxo do Norte, com coordenadas 20°15'31.1"S 43°21'43.5"W, pertencente à bacia hidrográfica do Rio Doce, sendo posteriormente armazenadas em bombonas plásticas até o momento de uso no experimento. A areia utilizada foi adquirida na Fibrarp Piscinas, com coordenadas 20°39'26.8"S 42°51'19.5"W, e posteriormente lavada com uma solução de água sanitária na proporção de 0,5 mL de água sanitária por litro de água, permanecendo imersa por 24 horas. Após esse período, a areia foi enxaguada com água corrente para remover resíduos da solução.

#### **4.1.2. Design experimental**

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos distintos e cinco repetições cada, totalizando 20 unidades experimentais. Os tratamentos foram definidos com base na combinação da origem da água e do tipo de substrato, conforme descrito a seguir: grupo controle, composto por água tratada com areia como substrato (AT-A); tratamento 1, preparado com água tratada com rejeito de mineração como substrato (AT-R), tratamento 2, elaborado com água do Rio Doce com areia como substrato (AR-A); e tratamento 3, constituído por água do Rio Doce com rejeito de mineração como substrato (AR-R). Os peixes foram alojados em 20 aquários individuais com capacidade para 60 L cada. Cada aquário recebeu 25 alevinos, totalizando cinco réplicas por grupo. Como não é possível distinguir o sexo nesta fase de desenvolvimento, o estudo incluiu tanto juvenis machos quanto fêmeas.

Para assegurar o controle das condições experimentais, os aquários estavam equipados com sistemas de filtração adequados e aquecedores automáticos para manter a temperatura constante da água ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ). A iluminação foi padronizada para um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os alevinos foram alimentados com a mesma dieta de aclimatação, administrada três vezes ao dia. Resíduos alimentares foram removidos para evitar o acúmulo de compostos nitrogenados que pudessem comprometer o experimento.



**FIGURA 1:** Foto de parte dos aquários com lambaris-do-rabo-amarelo durante a exposição aos tratamentos com areia como substrato.



**FIGURA 2:** Foto de parte dos aquários com lambaris-do-rabo-amarelo durante a exposição aos tratamentos com rejeito de mineração como substrato.

#### **4.2. Eutanásia**

Após o período de exposição aos tratamentos, os peixes foram submetidos a procedimento de eutanásia utilizando Metanosulfonato de Tricaina (MS-222) na concentração de 500 mg/L.

#### **4.3. Análises de estresse oxidativo**

Após a eutanásia, brânquias foram coletadas de dois a três indivíduos por aquário experimental até atingir 100 mg de tecido. Esse procedimento foi repetido para a obtenção de 8 amostras por tratamento. Logo após, os fragmentos de brânquias foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para preservar a integridade das biomoléculas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em um ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises laboratoriais.

Para as análises de estresse oxidativo, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,2 mol/L contendo EDTA 1 mmol/L, ajustado para pH 7,4. O

homogeneizado foi preparado utilizando um homogeneizador de tecido (Omni, Kennesaw, GA, EUA). Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram utilizados para a quantificação dos biomarcadores de estresse oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes. A única exceção foi a análise da proteína carbonilada (PC), na qual o pellet foi utilizado. Entre os biomarcadores avaliados estavam o óxido nítrico (NO), um mediador de estresse celular. A oxidação proteica foi medida pelo conteúdo de carbonila proteica, enquanto a atividade das enzimas antioxidantes incluiu a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST). A proteína total foi quantificada para normalização dos dados. Essas análises bioquímicas foram conduzidas conforme os procedimentos descritos em Destro *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2023).

#### **4.3.1. Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada com base na capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol, utilizando tampão fosfato de potássio (5 mM, pH 8,0), ao qual foram adicionados a amostra e pirogalol (100 µM) para iniciar a reação. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm, considerando uma unidade de atividade da SOD como a quantidade necessária para inibir 50% da taxa de auto-oxidação do pirogalol.

#### **4.3.2. Atividade da catalase (CAT)**

Para medir a atividade da catalase (CAT), foi utilizado o peróxido de hidrogênio como substrato. A reação foi interrompida após três minutos com a adição de molibdato de amônio, e os valores de absorbância foram obtidos em 374 nm. A atividade enzimática foi expressa como unidades de CAT por miligrama de proteína, com base em curvas padrão preparadas com diluições de albumina bovina.

#### **4.3.3. Óxido nítrico (ON)**

A quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) foi realizada por meio da norma de Griess, incubando 50 µL dos sobrenadantes com o reagente de Griess por 10 minutos (Tsikas, 2007). A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas, e as concentrações de NO (µmol/L) foram determinadas por uma curva padrão de nitrito de sódio (0–100 µM).

#### **4.3.4. Atividade da glutathione S-transferase (GST)**

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi avaliada pela conjugação da glutathione reduzida (GSH) com 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB). A reação foi

monitorada a 340 nm por 60 segundos, utilizando o coeficiente de extinção molar de CDNB para calcular a formação do produto. Uma unidade de GST foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um micromol de produto por minuto por mililitro de amostra.

#### **4.3.5. Oxidação de proteínas (PC)**

O dano oxidativo às proteínas foi avaliado pela reação dos grupos carbonilas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Os pellets de proteínas foram tratados com DNPH, e os produtos da reação foram lavados e resolubilizados com dodecil sulfato de sódio (SDS) para leitura em 370 nm. A concentração de carbonilas foi determinada com base no coeficiente de extinção molar, sendo expressa em nanomols por miligrama de proteína.

#### **4.3.6. Proteínas totais (PT)**

Em relação a quantificação de proteínas totais, esta foi realizada utilizando albumina bovina como padrão. Adicionalmente, estes foram utilizados como base para as análises estatísticas dos dados referentes aos ensaios de estresse oxidativo.

As análises foram realizadas em duplicata, exceto pela determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST), que foi realizada em triplicata, para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Para a quantificação das atividades enzimáticas, utilizou-se um espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japão) e um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

### **4.4. Análise estatística**

A distribuição dos dados foi determinada pelo teste Kolmogorov-Smirnov, utilizando o software R® versão 4.2.1 (R Core Team 2022). Os dados que incluíram distribuição normal foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA Two Way), com o intuito de analisar a interação entre água e substrato. Quando a interação não foi significativa entre esses dois fatores ( $p > 0,05$ ), o termo de interação foi removido, e o modelo foi simplificado para avaliar os efeitos principais individualmente. Logo após, foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi realizada a conversão para escala logarítmica. Um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado para todas

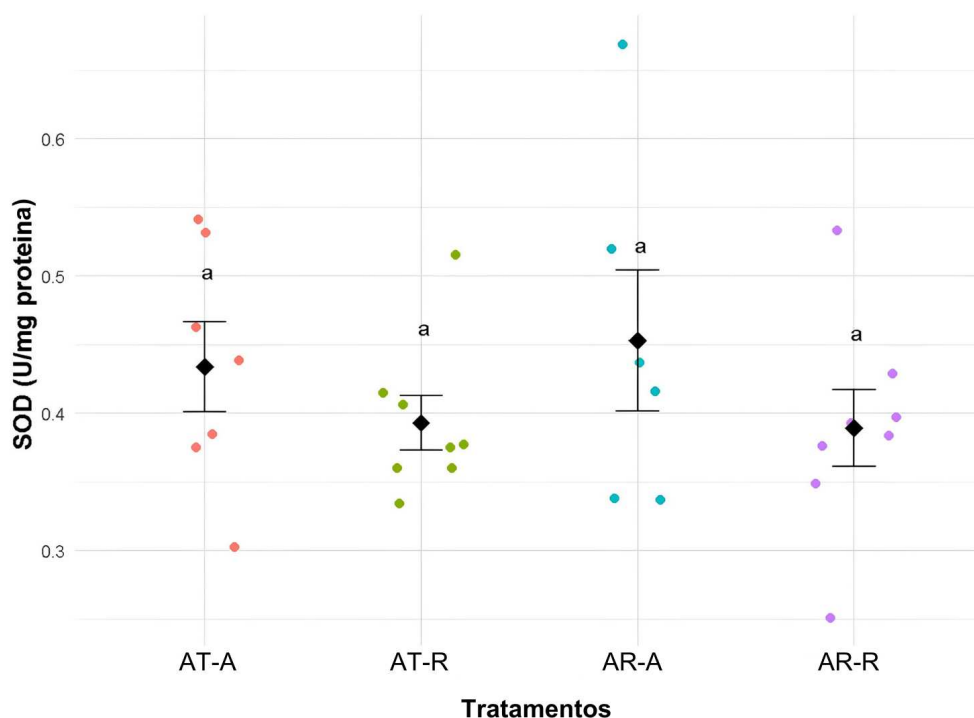
as análises realizadas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estresse oxidativo de brânquias

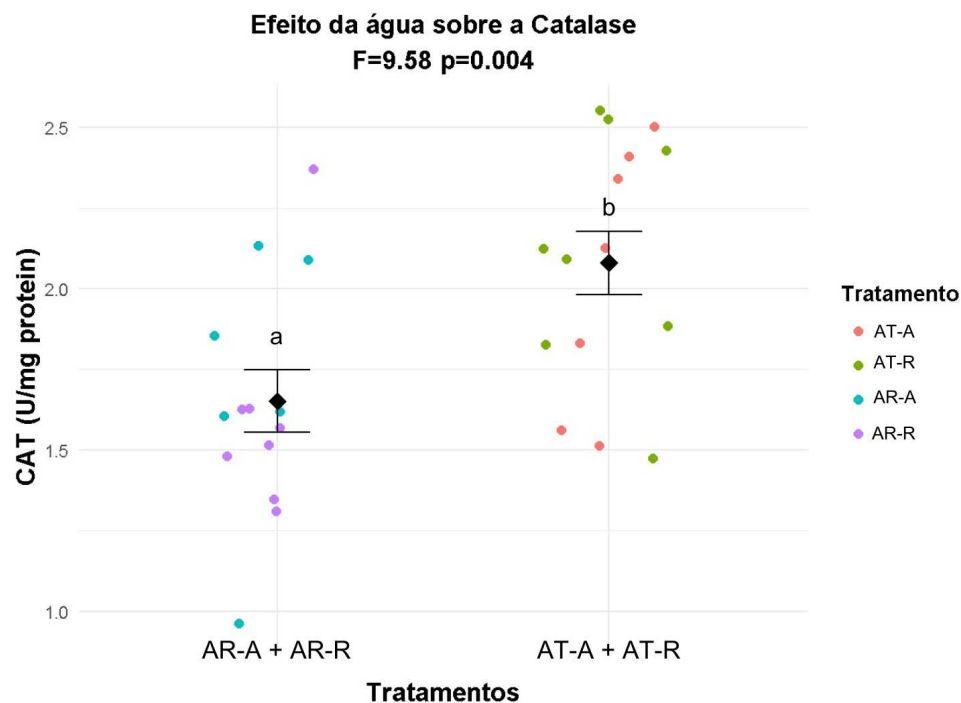
Para todas as variáveis analisadas (CAT, SOD, ON, PC e GST), a interação entre água e substrato não foi significativa ( $p > 0,05$ ), indicando que esses fatores atuaram de forma independente sobre as respostas.

Para a concentrações de enzima SOD, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos avaliados ( $p > 0,05$ ).



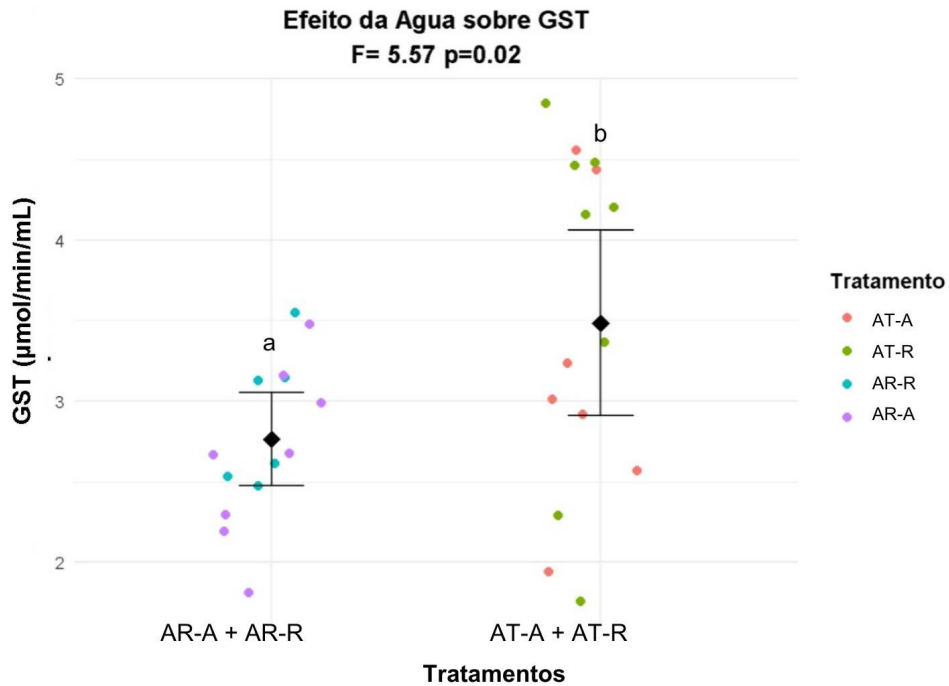
**FIGURA 3:** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n=8$  para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.

A atividade da enzima CAT foi influenciada significativamente pela água ( $p=0,004$ ), em que os grupos expostos a tratamentos com água tratada (AT-A e AT-R) apresentaram níveis maiores se comparado aos tratamentos expostos à água do Rio Doce (AR-A e AR-R). Não houve influência do substrato nos níveis dessa enzima antioxidante.



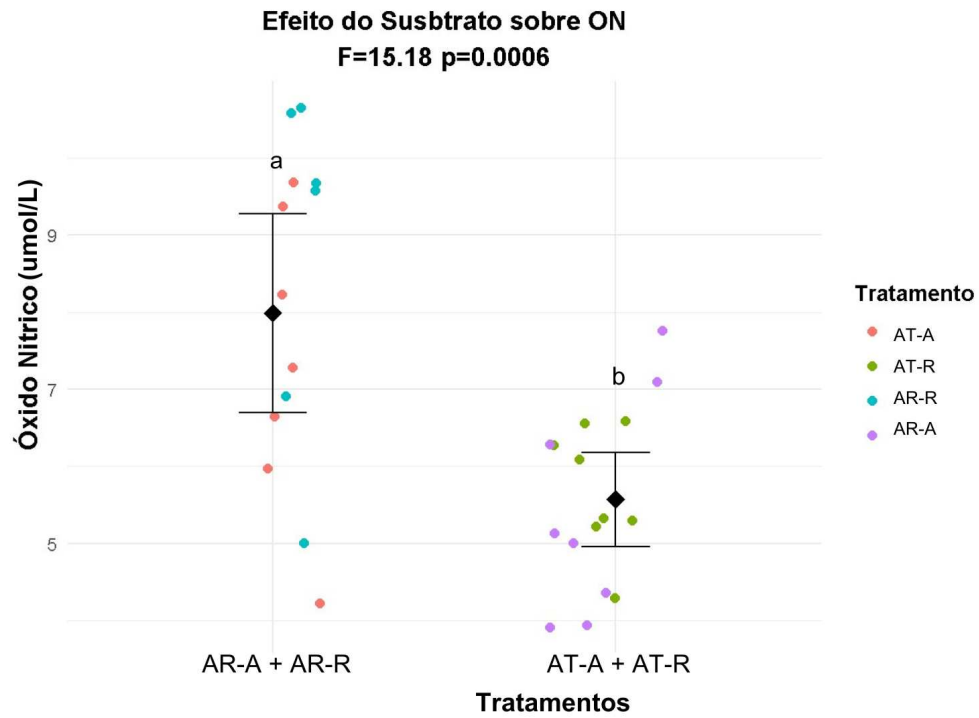
**FIGURA 4:** Atividade da enzima catalase (CAT). Os dados são apresentados como média  $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n=8$  para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.

De forma similar ao resultado anterior, a atividade da GST, apresentou diferença significativa entre os tratamentos, apenas com a água influenciando na resposta ( $p=0,02$ ). Os peixes expostos aos tratamentos com água tratada (AT-A e AT-R) apresentaram níveis mais elevados de SOD, em comparação àqueles expostos à água do Rio Doce (AR-A e AR-R).

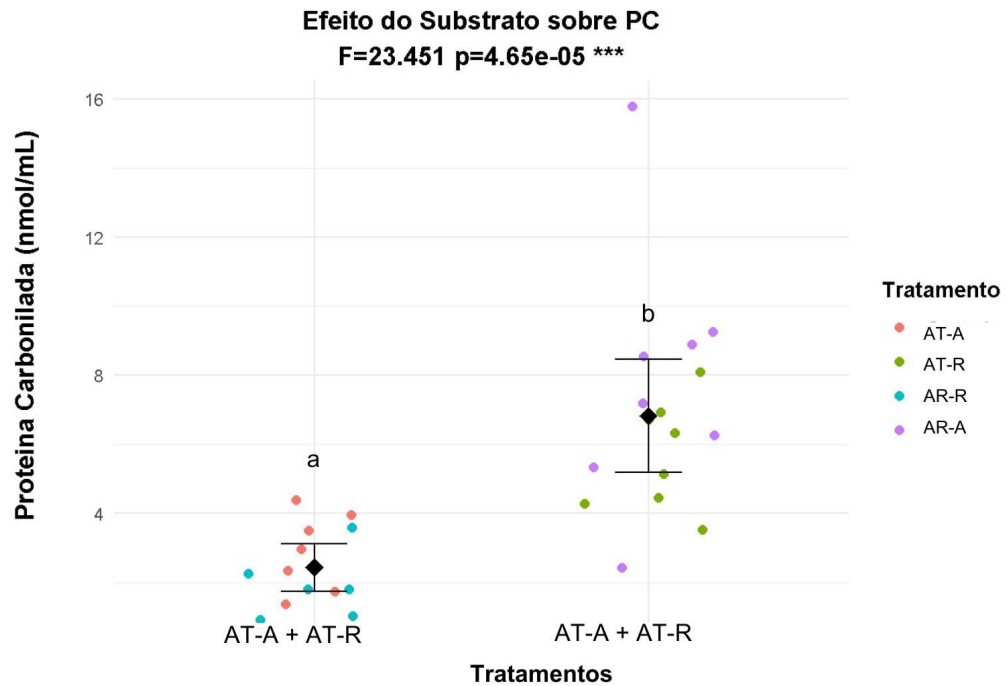


**FIGURA 5:** Níveis de glutationa-S-transferase (GST). Os dados são apresentados como média  $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n= 8$  para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.

A produção de óxido nítrico (ON) foi significativamente influenciada pelo tipo de substrato ( $p=0,0006$ ). Peixes mantidos em substrato de rejeito (AT-R e AR-R) apresentaram menores níveis de ON quando comparados aos mantidos em substrato de areia (AT-A e AR-A). Os níveis de proteínas carboniladas (PC) também apresentaram variações significativas entre os tratamentos ( $p=0,002$ ). Os peixes expostos ao rejeito como substrato (AT-R e AR-R) apresentaram os maiores níveis de PC. Em contraste, os tratamentos com substrato de areia (AT-A, e AR-A) resultaram nos menores níveis de PC.



**FIGURA 6:** Níveis de óxido nítrico (ON). Os dados são apresentados como média  $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n= 8$  para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.



**FIGURA 7:** Níveis de proteína carbonilada (PC). Os dados são apresentados como média  $\pm$ DP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ). Os pontos no gráfico representam as amostras de cada tratamento ( $n=8$  para cada tratamento), em que foi realizado o pool dos fragmentos de brânquias até que estes atingissem 100mg.

## 6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que a exposição simultânea a diferentes poluentes pode gerar interações sinérgicas, amplificando os efeitos tóxicos nos organismos aquáticos. Heys et al. (2016) e Kaushal et al. (2018) documentaram que misturas de metais pesados, compostos orgânicos e resíduos industriais podem resultar em "coquetéis químicos reativos", potencializando os danos oxidativos mesmo quando as concentrações individuais de cada substância estão dentro dos limites considerados seguros. No entanto, no presente estudo, a ausência de interação significativa entre os fatores "água" e "substrato" ( $p > 0,05$ ), sugere que os contaminantes do Rio Doce e do rejeito de mineração atuam de maneira independente, sem amplificação significativa dos efeitos. Isso está alinhado Passos *et al.* (2020), que relataram que a água do Rio Doce e os sedimentos presentes no estuário do rio, que são frequentemente ressuspensos, em conjunto não geraram toxicidade em *A.*

*lacustris*.

A atividade de enzima SOD não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ). Há uma tendência de aumento das enzimas antioxidantes em peixes expostos a metais, sugerindo um mecanismo compensatório para lidar com os níveis elevados de EROS (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 de  $O_2\bullet$  e da CAT na quebra do  $H_2O_2$  para água e oxigênio molecular. Ademais, as GSTs são enzimas cruciais na detoxificação de xenobióticos, atuando em conjunto com a CAT e a SOD na primeira linha de defesa antioxidante (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). Estas enzimas catalisam a conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, tornando os produtos mais solúveis em água e facilitando sua excreção (TORRES, SOARES e MARIA; 2004). Weber *et al.* (2020) determinaram os níveis de SOD em duas espécies de peixes nativas expostas a rejeitos de mineração. De forma similar ao encontrado neste trabalho, não foram observadas alterações nos níveis de SOD em *Hypostomus affinis*. Desse modo, a falta de alterações significativas na atividade da SOD sugere que essa via de defesa não pode controlar adequadamente os níveis de radicais livres, como o  $O_2\bullet$ , permitindo o acúmulo de EROs e possivelmente levando a danos oxidativos nas células.

A presença de metais na água está ligada a indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e no desencadeamento do estresse oxidativo em organismos aquáticos. Metais de transição, como o Fe, podem participar de reações redox através da ocorrência da reação de Fenton, que gera radicais  $OH\bullet$  a partir do peróxido de hidrogênio (LEE *et al.*, 2019). Passos *et al.* (2020) relataram a presença de altas concentrações de Fe e Mn no estuário do Rio Doce, inclusive observando bioacumulação de Fe no fígado e de Mn tanto no fígado quanto nas brânquias de *Astyanax lacustris*. Esse acúmulo pode interferir na regulação iônica, respiração celular e resultar em uma produção descontrolada de EROs. Em condições normais, as células possuem mecanismos para neutralizar essas EROs. Contudo, exposições prolongadas ou concentrações excessivamente altas de metais podem sobrecarregar essas vias de defesa, resultando em danos oxidativos (Lushchak, 2016). Os dados sobre a presença de metais desses estudos do Rio Doce são corroborados por Duarte *et al.* (2021) e Mourão *et al.* (2023), que observaram altos níveis de Fe, Mn, Al, além de outros metais e metaloides nos sedimentos do Rio Doce, mesmo após mais de seis anos do rompimento da barragem.

A redução da atividade da CAT e GST observada em peixes expostos à água do Rio Doce sugere um comprometimento significativo das defesas antioxidantes frente ao estresse oxidativo induzido pela contaminação. Resultados semelhantes foram relatados por Passos *et al.* (2020), que observaram que a exposição de peixes à água do Rio Doce, devido à presença de metais, resultou em alterações bioquímicas, enquanto o substrato do rio não apresentou efeitos negativos. Esses efeitos indicam que a própria água do rio foi suficiente para desencadear disfunções metabólicas nos peixes, independentemente da presença de sedimentos e suspensão desses na coluna d'água. Ademais, as brânquias, por serem o primeiro ponto de contato com a água contaminada, são particularmente vulneráveis à penetração de metais e outros poluentes. Conforme relatado por Lushchak, (2016) a atividade da CAT e GST tendem a aumentar em resposta à presença de poluentes ambientais, uma vez que essas enzimas pertencem à primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo. No entanto, 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). Desse modo, a diminuição das atividades da CAT e GST pode ser um indicativo de exaustão enzimática, fenômeno comum em exposições crônicas a poluentes, onde a produção contínua de EROs supera a capacidade de resposta do sistema antioxidante.

O óxido nítrico (ON) é uma molécula essencial na sinalização celular e desempenha diversas funções biológicas nos organismos aquáticos. Ainda, este é considerado um biomarcador sensível para avaliar respostas ao estresse em peixes (Peter *et al.*, 2022). No presente estudo, os níveis de ON foram significativamente influenciados pelo tipo de substrato utilizado. Peixes mantidos em substratos de rejeito mineração (AT-R e AR-R) apresentaram níveis reduzidos de ON quando comparados àqueles expostos a substratos de areia (AT-A e AR-A). Segundo Choudhury e Saha (2016), o aumento na produção de ON está relacionada a uma maior formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), indicando uma possível resposta de estresse oxidativo à presença de contaminantes. Contrariamente, a redução de seus níveis em tecidos pode refletir uma menor exposição a xenobióticos ou combate eficiente dos radicais livres pela defesa antioxidante. Além disso, a diminuição do ON nas brânquias pode estar relacionada à formação de espécies reativas de nitrogênio, como o ONOO• resultante da interação entre o ON e o O<sub>2</sub>• (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 ON seja

consequência de sua interação com o  $O_2^\bullet$ , levando à formação do  $ONOO^\bullet$ . Esse efeito é corroborado pela ausência de alterações nos níveis SOD, indicando uma incapacidade do sistema antioxidante em controlar a produção de radicais livres, e pelos danos oxidativos observados nas proteínas celulares.

Neste estudo, foi observado o aumento dos níveis de PC nas brânquias de peixes expostos ao rejeito de mineração. Este achado está alinhado com os resultados de Vieira *et al.* (2022), que identificaram concentrações elevadas de proteínas carboniladas em peixes oriundos da Bacia do Rio Doce após o desastre ambiental causado pelo rompimento da barragem. O ferro, em sua forma solúvel  $Fe^{2+}$ , é quimicamente instável e tende a oxidar-se na presença de oxigênio, formando  $O_2^\bullet$ , que reagem com cadeias laterais de aminoácidos, originando derivados carbonílicos. Bagnyukova *et al.* (2006) também relataram o aumento dos níveis de grupos carbonila em proteínas de peixes submetidos à exposição a concentrações elevadas de ferro, um padrão consistente com os dados observados no presente estudo. A carbonilação de proteínas, uma das principais marcas do estresse oxidativo, resulta em mau funcionamento das biomoléculas, aumento da toxicidade celular e pode levar à morte celular por apoptose. Além disso, o acúmulo de espécies carboniladas está associado ao desencadeamento de processos inflamatórios e respostas autoimunes, contribuindo para danos celulares e fisiológicos significativos (FEDOROVA *et al.*, 2013; HAUCK *et al.*, 2019). Assim, os níveis elevados de proteínas carboniladas (PC) registrados em peixes expostos ao rejeito de mineração reforçam o uso deste parâmetro como um biomarcador eficaz de dano oxidativo irreversível.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a exposição ao rejeito da Bacia do Rio Doce influenciou diferentes biomarcadores de estresse oxidativo em *Astyanax lacustris*. A ausência de interação significativa entre os fatores "água" e "substrato" indica que os contaminantes presentes no Rio Doce e no rejeito de mineração atuam de forma independente, sem potencialização dos efeitos tóxicos.

Além disso, não foram observadas alterações significativas na atividade da SOD o que sugere que a defesa antioxidante dos peixes não foi suficiente para neutralizar completamente as EROs, favorecendo o acúmulo de danos oxidativos. Em contrapartida, a redução da atividade das enzimas CAT e GST em peixes expostos à água do Rio Doce indica um comprometimento das defesas antioxidantes, possivelmente devido à sobrecarga celular gerada pela exposição prolongada aos poluentes. Ademais, a diminuição dos níveis de óxido nítrico (ON) nos peixes mantidos em substrato de rejeito de mineração sugere a formação de ONOO•, por meio do ON• e o O<sub>2</sub>•, um radical livre com elevada toxicidade celular. Além disso, o aumento dos níveis de PC reforça o impacto da contaminação por metais pesados, uma vez que a carbonilação de proteínas é um marcador de dano oxidativo irreversível, afetando funções celulares essenciais e podendo levar à morte celular.

Os dados obtidos reforçam a complexidade das respostas de estresse oxidativo nos organismos aquáticos, evidenciando que diferentes biomarcadores podem responder de maneira específica às condições ambientais e à exposição a xenobióticos. Assim, o uso de um conjunto abrangente de biomarcadores é essencial para uma avaliação mais precisa dos impactos ecotoxicológicos. Ainda, destaca-se o papel dos peixes e especialmente das brânquias, como bioindicadores sensíveis para o monitoramento dos impactos de metais e outros poluentes em ecossistemas aquáticos.

Por fim, este estudo ressalta a importância da continuidade de pesquisas ecotoxicológicas externas à avaliação dos impactos de rejeitos de mineração sobre a fauna aquática do Rio Doce. Tais pesquisas fornecem suporte para iniciativas voltadas à preservação da saúde desse ecossistema e à melhoria da qualidade de vida das comunidades que dependem de recursos provenientes dele.

## 8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA Nacional de Águas (ANA). **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.

ALE, A.; BACCHETTA, C.; ROSSI, A. S.; GALDOPÓRPORA, J.; DESIMONE, M. F. et al. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 148, 976–984, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.072>.

AMQAM, H.; THALIB, D.; ANWAR, D.; SIRAJUDDIN, S.; MALLONGI, A.. Human health risk assessment of heavy metals via consumption of fish from Kao Bay. **Reviews On Environmental Health**, v. 35, n. 3, p. 257-263, 2020. doi: <https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0023>.

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>.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732010000400013>.

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>.

BRRACH, O.S., JANGU, S. Some aspects of reproductive biology on effect of heavy metal pollution on the histopathological structure of gonads in *Labeo rohita* (Hamilton-Buchanan) from Harike wetland, India. **Int. J. Fish. Aquac.** v. 7, p. 9–14, 2015. doi: <https://doi.org/10.5897/IJFA15.0469>.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A.. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 3025-3033, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.055>.

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>.

COPPO, G.C., PASSOS, L.S., LOPES, T.O.M., PEREIRA, T.M., MERÇON, J., CABRAL, D.S., *et al.* Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Ecotoxicology** 27, 1150–1160, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1970-0>.

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, A. L. F.; *et al.* Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, n. 111601, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111601>.

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>.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R.. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal Of**

**Environmental Research And Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158-165, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph2007040011>.

FERNANDES, G. W.. *et al.* Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. **Natureza & Conservação: Brazilian Journal of Nature Conservation**, v. 14, n. 2, p. 35-45, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncon.2016.10.003>.

FERREIRA, Frederico Fernandes *et al.* Impacts of the Samarco Tailing Dam Collapse on Metals and Arsenic Concentration in Freshwater Fish Muscle from Doce River, Southeastern Brazil. **Integrated Environmental Assessment And Management**, v. 16, n. 5, p. 622-630, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ieam.4289>.

FONSECA, A.R.; *et al.* The impact of freshwater metal concentrations on the severity of histopathological changes in fish gills: a statistical perspective. **Science Of The Total Environment**, v. 599-600, p. 217-226, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.196>.

GARNERO, Paola L. *et al.* Assessment of exposure to metals, As and Se in water and sediment of a freshwater reservoir and their bioaccumulation in fish species of different feeding and habitat preferences. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 163, p. 492-501, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.023>.

HAJRIC, D.; *et al.* Risk assessment of heavy metal exposure via consumption of fish and fish products from the retail market in Bosnia and Herzegovina. **Food Control**, v. 133, p. 1-9, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108631>.

HEYS, Kelly A. *et al.* Risk assessment of environmental mixture effects. **Rsc Advances**, v. 6, n. 53, p. 47844-47857, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra05406d>.

HOQUE, Md.; *et al.* Probabilistic public health risks associated with pesticides and heavy metal exposure through consumption of common dried fish in coastal regions of Bangladesh. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 29, n. 14, p.

20112-20127, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17127-9>.

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>.

INSTITUTO Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). **Laudo Técnico Preliminar**: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Brasília, 2015. 38 p.

JAKIMSKA, Anna *et al.* Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1117-1125, 2011.

JIJIE, Roxana *et al.* Antagonistic effects in zebrafish (*Danio rerio*) behavior and oxidative stress induced by toxic metals and deltamethrin acute exposure. **Science Of The Total Environment**, v. 698, p. 134299, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134299>.

KAUSHAL, Sujay S. *et al.* Watershed 'chemical cocktails': forming novel elemental combinations in Anthropocene fresh waters. **Biogeochemistry**, v. 141, p. 281-305, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0502-6>.

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>.

LIMA, Marcelo Hermes. Free Radicals and Oxidizing agents in biology. In: STOREY, Kenneth B. (ed.). **Functionul Metabolism**: regulation and adaptation. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. Cap. 12. p. 319-368.

LUCENA, Carlos A. S. de; SOARES, Helena G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101-125, 28 jan. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>.

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>.

MACÊDO, A. K. S.; *et al.* Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 735, p. 139505, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139505>.

MARGARITELIS, N. V. *et al.* Adaptations to endurance training depend on exercise-induced oxidative stress: exploiting redox interindividual variability. **Acta Physiologica**, v. 222, n. 2, p. 1708-1724, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12898>.

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>.

MERÇON, Julia *et al.* Evidence of reproductive disturbance in *Astyanax lacustris* (Teleostei: characiformes) from the doce river after the collapse of the fundão dam in mariana, brazil. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 28, n. 47, p. 66643-66655, 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-15238-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>.

NIMET, J.; *et al.* Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. **Environmental Monitoring And Assessment**, v. 192, n. 1, p. 1-13, 2019. doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8030-y>.

PANDEY, S.; *et al.* Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 3, p. 183-192, 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.014>.

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>.

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<sup>+</sup> homeostasis during hypoxia. **Frontiers In Physiology**, v. 13, p. 1-14, 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.821300>.

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](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8_5).

RAY, Suryapratap; VASHISHTH, Rahul. From water to plate: reviewing the bioaccumulation of heavy metals in fish and unraveling human health risks in the food chain. **Emerging Contaminants**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100358>.

SALVADOR, Gilberto N. *et al.* Influences of multiple anthropogenic disturbances coupled with a tailings dam rupture on spatiotemporal variation in fish assemblages of a tropical river. **Freshwater Biology**, v. 67, n. 10, p. 1708-1724, 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/fwb.13967>.

SANTOLIN, N. J.; *et al.* Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, n. 2, p. 1235-1248, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4115-2>.

SANTOS, Daiane Cristina Marques dos *et al.* Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Experimental And Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7-8, p. 861-866, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.007>.

SANTOS, *et al.* Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Experimental And Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7-8, p. 861-866, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.007>.

SAULIUTÉ, Gintarė *et al.* Response patterns of biomarkers in omnivorous and carnivorous fish species exposed to multicomponent metal (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) mixture. Part III. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 3, p. 258-274, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-020-02170-y>.

SAVASSI, Lourenço Almeida *et al.* Heavy Metals and Histopathological Alterations in *Salminus franciscanus* (Lima & Britski, 2007) (Pisces: characiformes) in the paraopeba river, minas gerais, brazil. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 478-483, 2016. Springer Science and Business Media LLC. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-016-1732-8>.

SEVCIKOVA, M. *et al.* Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 11, p. 537-546, 2011. doi: 10.17221/4272-VETMED.  
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>.

SILVA, Emanuelle Pereira da *et al.* Genotoxic effect of heavy metals on *Astyanax lacustris* in an urban stream. **Heliyon**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05034>.

SILVA, S. B.; *et al.* Exposure to the herbicide atrazine induces oxidative imbalance, morphological damage and decreased survival in juvenile fish. **Bioscience Journal**. Viçosa, p. 1-17, 2023. doi: <https://doi.org/10.14393/BJ-v39n0a2023-65784>.

TERÁN, Guillermo E. *et al.* Opening the Trojan horse: phylogeny of *astyanax*, two new genera and resurrection of *psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal Of The Linnean Society**, p. 1217-1234, 11 abr. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa019>.

THOPHON, S *et al.* Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 3, p. 307-320, 2003. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00270-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00270-1).

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>.

VASCONCELLOS, Ana Claudia Santiago de *et al.* Health Risk Assessment of Mercury Exposure from Fish Consumption in Munduruku Indigenous Communities in the Brazilian Amazon. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 18, n. 15, p. 7940, 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18157940>.

VÄÄNÄNEN, Kristiina *et al.* Ecotoxicity assessment of boreal lake sediments affected by metal mining: sediment quality triad approach complemented with metal bioavailability and body residue studies. **Science Of The Total Environment**, v. 662, p. 88-98, 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.209>.

VICQ, Raphael de *et al.* Iron Quadrangle stream sediments, Brazil: geochemical maps and reference values. **Environ Earth Sci**, v. 74, p. 4407-4417, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4508-2>.

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>.

WINSTON, Gary W.; GIULIO, Richard T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 137-161, 1991. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445x\(91\)90033-6](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445x(91)90033-6).

XIA, Zhengyuan *et al.* AntioxidantN-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. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10715760500484336>.