



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Grazielle Christine de Mattos da Silva

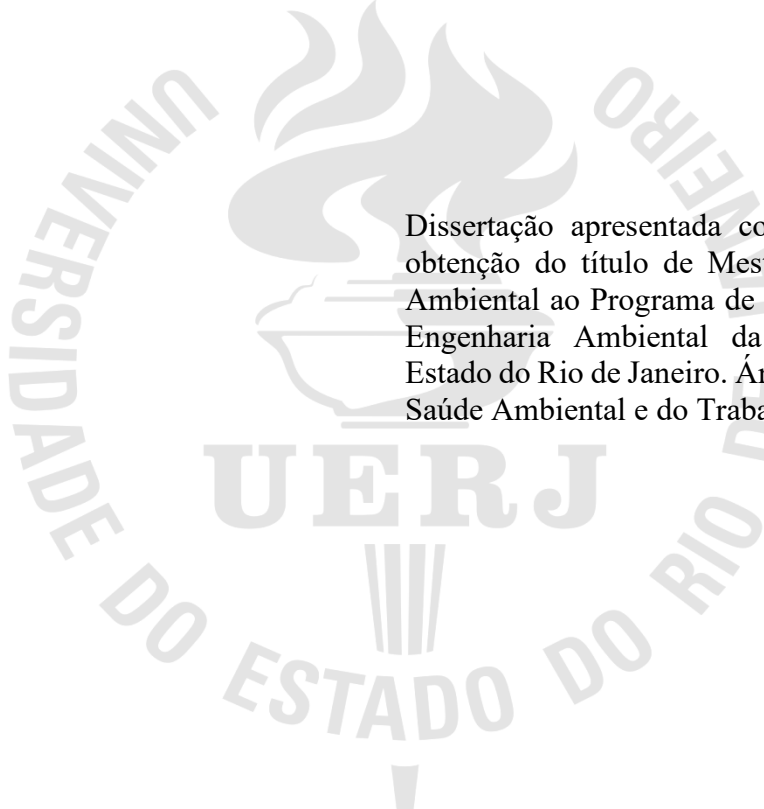
**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM ANFÍBIOS ORIUNDOS DE UM
SEGMENTO DE RIO IMPACTADO POR ATIVIDADES DE
MINERAÇÃO DE FERRO EM MINAS GERAIS (MG)**

Rio de Janeiro

2024

Grazielle Christine de Mattos da Silva

**Avaliação genotóxica em anfíbios oriundos de um segmento de rio impactado por
atividades de mineração de ferro em Minas Gerais (MG)**



Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Saúde Ambiental e do Trabalho.

Orientador: Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Talione Sabagh

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

S586 Silva, Grazielle Christine de Mattos da.
Avaliação genotóxica em anfíbios oriundos de um segmento de rio impactado por atividades de mineração de ferro em Minas Gerais (MG) / Grazielle Christine de Mattos da Silva. – 2024.
69 f.

Orientador: André Luís de Sá Salomão.
Coorientador: Leandro Talione Sabagh.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Rios - Minas Gerais - Teses. 3. Ferro - Minas e mineração - Teses. 4. Toxicologia ambiental - Teses. 5. Toxicologia genética - Teses. 6. Anfíbios - Teses. I. Salomão, André Luís de Sá. II. Sabagh, Leandro Talione. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 504.35

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Grazielle Christine de Mattos da Silva

**Avaliação genotóxica em anfíbios oriundos de um segmento de rio impactado por
atividades de mineração de ferro em Minas Gerais (MG)**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Saúde Ambiental e do Trabalho.

Aprovada em

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão - Orientador
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Dr. Leandro Talione Sabagh - Coorientador
COPPE - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira
Faculdade de Engenharia - UERJ

Dr. Sidney Fernandes Sales Junior
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Ricardo Gonçalves Cesar
Geologia - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida mãe, Rosely da Silva, cujo amor incondicional, zelo e fé em meu potencial sempre me inspiraram e motivaram. Também dedico ao meu amado pai, Ildefonso Monteiro, cujo apoio, carinho e cuidado foram fundamentais em minha jornada. Embora não esteja mais entre nós, seus ensinamentos continuam a guiar-me, e é com imenso carinho que honro sua memória neste momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus queridos pais, Rosely da Silva e Ildefonso Monteiro (*in memoriam*), pelo apoio constante, pela sabedoria compartilhada e pelo amor incondicional. Seus ensinamentos e a força que sempre me transmitiram foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Agradeço também aos meus amigos e familiares que têm sido uma fonte constante de amor e apoio em minha vida. Agradeço por cada gesto de carinho e cada palavra de encorajamento. Em especial, agradeço aos meus queridos avós, Darcy e Zilá, aos meus tios Silvana e Carlos André, aos meus primos Juan, Vittor, Daphyne e Enmilly, ao meu adorável sobrinho Dereck e à minha querida amiga Carolina. Sou imensamente grata por ter pessoas tão especiais como vocês em minha vida.

Minha sincera gratidão aos amigos do grupo de pesquisa BIOTEMA. Em especial Priscila, Alenne, Adriana Curty, Adriana Pereira, Rayssa, a professora Lia e a minhas queridas ICs Nathália e Larissa. Suas palavras de incentivo e apoio foram como uma luz constante durante minha jornada no laboratório e nos momentos descontraídos das pausas para o café. Agradeço por fazerem parte dessa jornada ao meu lado.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao meu coorientador, Leandro Sabagh, pelo valioso auxílio e orientação nas pesquisas. Seu comprometimento e expertise foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Agradeço também ao meu orientador, André Salomão, pelo inestimável suporte, orientação e inspiração ao longo deste trabalho. Seus ensinamentos, incentivos, paciência e dedicação foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico. Sou imensamente grata pela confiança que depositou em mim para prosseguir com esse projeto.

Agradeço ao Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental e à minha amada UERJ pela oportunidade, pelo aprendizado e pelo suporte ao longo desta jornada, que foram essenciais para minha formação e realização desta dissertação.

Por fim, gostaria de agradecer à COPPETEC e Vale S.A. pelo financiamento do Projeto “Estudo sobre a Biota Aquática e Comunidades Ripárias no Rio Paraopeba”, que foi fundamental para o sucesso desse trabalho. Além disso, gostaria de estender meus agradecimentos à dedicada equipe de herpetofauna, Nathan, Luiz, Ugioni, Kássia e Vitor,

cujo trabalho árduo e comprometimento foram fundamentais para alcançarmos esses resultados.

O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.

Robert Collier

RESUMO

SILVA, Grazielle Christine de Mattos da. *Avaliação genotóxica em anfíbios oriundos de um segmento de rio impactado por atividades de mineração de ferro em Minas Gerais (MG)*. 2024. 69 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Áreas com atividades mineradoras estão sujeitas à contaminação em ambientes aquáticos e terrestres, além do risco de desastres, como o rompimento da barragem em Brumadinho (MG) em 2019. Por isso o monitoramento constante dessas áreas é fundamental. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o potencial genotóxico em células sanguíneas de anuros às margens do Rio Paraopeba, após esse desastre. Foram avaliados 349 anfíbios de 8 espécies diferentes (*Leptodactylus luctator*, *Leptodactylus fuscus*, *Rhinella diptycha*, *Rhinella* gr. *crucifer*, *Boana crepitans*, *Boana faber*, *Boana lundii* e *Scinax* cf. *fuscovarius*). Foi coletado o material sanguíneo para preparo de lâminas em triplicata, sendo avaliadas 2000 células/lâmina (1000x em microscópio óptico). Os metais (Al, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni e Zn) foram avaliados nas amostras de sedimento superficial por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e atomização eletrotérmica (ETAAS). As análises estatísticas foram realizadas no *software* R por função GLM, com a família quasi-binomial para seguintes variáveis: frequência de anomalias, distância da confluência, massa, CRC, espécie, sexo, estágio de desenvolvimento e metais e semimetais. As espécies *L. luctator*, *R. diptycha* e *B. faber* demonstraram ampla distribuição ao longo do rio. A maior média de frequência de anomalias nucleares foi no primeiro ponto de coleta após a área impactada (9,47%). As concentrações médias (ppm) de Fe [281,64-618,19], Al [138,28 -459,51] e Mn [71,23-227,08] no sedimento foram altas ao longo de todo o rio. As maiores concentrações médias para Al, Ar, Co, Cr, Cu, Ni e Zn foram pontos amostrados a jusante do rompimento barragem. O sexo não foi significativo em nenhum modelo estatístico. O CRC ($p \leq 0,01$) e a massa ($p \leq 0,1$) foram significativos. O Cr foi o único metal que foi significativo ($p \leq 0,05$) e diretamente proporcional à frequência de anomalias nucleares. Conclui-se que, embora haja evidências de contaminação por metais e semimetais no rio, trata-se de uma área multi-impactada e, ainda são necessários estudos adicionais para comprovar a relação dessa contaminação com o desastre ocorrido.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Anuros; Metais; Mineração; Ecotoxicidade.

ABSTRACT

SILVA, Grazielle Christine de Mattos da. *Genotoxic evaluation in amphibians from a river segment impacted by iron mining activities in Minas Gerais (MG)*. 2024. 69 f. Dissertation (Professional MSc in Environmental Engineering) – Faculty of Engineering, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, 2024.

Areas with mining activities are subject to contamination in aquatic and terrestrial environments, in addition to the risk of disasters, such as the collapse of the dam in Brumadinho (MG) in 2019, which is why constant monitoring of these areas is essential. The present study aimed to evaluate the genotoxic potential in anuran blood cells on the banks of the Paraopeba River, after this disaster. 349 amphibians from 8 different species were evaluated (*Leptodactylus luctator*, *Leptodactylus fuscus*, *Rhinella diptycha*, *Rhinella* gr. *crucifer*, *Boana crepitans*, *Boana faber*, *Boana lundii* and *Scinax* cf. *fuscovarius*). Blood material was collected and 3 slides/individual were prepared (fixed in Methanol P.A. and stained in Giemsa 5%), with 2000 cells/slide being evaluated (1000x under an optical microscope). Metals (Al, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni and Zn) were evaluated in surface sediment samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and electrothermal atomization (ETAAS). Statistical analyzes were performed in the R software using the GLM function, with the quasi-binomial family for the following variables: frequency of anomalies, distance from confluence, mass, CRC, species, sex, stage of development and metals and semimetals. The species *L. luctator*, *R. diptycha* and *B. faber* demonstrated a wide distribution along the river. The highest average frequency of nuclear anomalies was at the first collection point after the impacted area (9.47%). The average concentrations (ppm) of Fe [281.64-618.19], Al [138.28 - 459.51] and Mn [71.23-227.08] in the sediment were high throughout the river. The highest average concentrations for Al, Ar, Co, Cr, Cu, Ni and Zn were sampled points downstream of the dam failure. Sex was not significant in any statistical model. CRC ($p \leq 0.01$) and mass ($p \leq 0.1$) were significant. Cr was the only metal that was significant ($p \leq 0.05$) and directly proportional to the frequency of nuclear anomalies. It is concluded that, although there is evidence of contamination by metals and semi-metals in the river, its condition as an area affected by multiple impacts, additional studies are necessary to prove the relationship of this contamination with the disaster that occurred.

Keywords: Genotoxicity; Anurans; Metals; Mining; Ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bacias Hidrográficas de Minas Gerais. Bacia do Rio São Francisco (15) em MG.....	28
Figura 2 - Unidades Estratégicas de Gestão das águas em Minas Gerais.	29
Figura 3 - Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Paraopeba, sedes municipais e os principais cursos d'água.	30
Figura 4 - Rio Paraopeba em Minas Gerais - MG no ponto M28 (latitude -20,259357, longitude -44,122472) no dia 3 de agosto de 2023.....	31
Figura 5 - Mapa da Bacia do Rio Paraopeba com as marcações dos pontos de coleta (Herpetofauna), local do desastre (Barragem B1) e ponto do Ribeirão Ferro-Carvão com o Rio Paraopeba (Confluência Ferro-Carvão).	34
Figura 6 - Coleta de anfíbios às margens do Rio Paraopeba. (a) Busca ativa noturna; (b) Coleta do indivíduo.....	36
Figura 7 - Avaliação de parâmetros morfológicos dos anuros coletados às margens do Rio Paraopeba: (a) comprimento rosto cloacal (CRC) utilizando um paquímetro digital e (b) massa utilizando uma balança analítica.....	37
Figura 8 – Preparo das lâminas com amostras de sangue dos anuros coletados às margens do Rio Paraopeba. (a) Técnica do esfregaço, (b) lâminas secando após retirada do banho de fixação com metanol e (c) lâminas secando após retiradas do banho de coloração com Giemsa a 5%.	38
Figura 9 - Espécies de anfíbios anuros coletados: <i>Leptodactylus luctator</i> (a), <i>Leptodactylus fuscus</i> (b), <i>Rhinella diptycha</i> (c), <i>Rhinella</i> gr. <i>crucifer</i> (d), <i>Boana crepitans</i> (e), <i>Boana faber</i> (f), <i>Boana lundii</i> (g) e <i>Scinax</i> cf. <i>fuscovarius</i> (h). 45	
Figura 10 - Micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (AN) em eritrócitos das espécies de anfíbios analisadas em microscópio 1000X. Núcleo normal (a), micronúcleo (b), núcleo <i>bebbled</i> (c), núcleo lobulado (d) e binúcleo (e).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura dos pontos de amostragem com sua respectiva localização (latitude e longitude) e classificação da área em: Controle (C) e Impactada (I).	32
Tabela 2 - Variáveis explicativas utilizadas em cada modelo.	41
Tabela 3 – Quantidade de indivíduos com material sanguíneo coletado por ponto amostral e por espécie.....	42
Tabela 4 - Quantitativo da identificação dos indivíduos quanto ao sexo (masculino e feminino) e estágio de desenvolvimento (jovem e adulto).	43
Tabela 5 – Características morfológicas das espécies de anuros coletadas às margens do Rio Paraopeba e pontos controle. Média [valor mínimo - valor máximo] do comprimento rosto cloacal (CRC) e massa dos indivíduos com os respectivos valores mínimo e máximo para cada espécie.	44
Tabela 6 - Média das concentrações de metais e semimetais em ppm (partes por milhão, mg/Kg) durante as 3 campanhas.	47
Tabela 7 - Quantitativo de lâminas por espécie e por ponto amostral com suas respectivas médias.	48
Tabela 8 – Frequência de anomalias nucleares (‰) em eritrócitos de anuros coletados ao longo do Rio Paraopeba e pontos controle por espécie e por ponto.	50
Tabela 9 - Significância estatística das variáveis explicativas no Modelo 3.....	52
Tabela 10 - Significância estatística das variáveis explicativas no Modelo 4.....	53
Tabela 11 - Significância estatística das variáveis explicativas no Modelo 5.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Faturamento anual do Brasil (em bilhões de reais), entre os anos de 2017 e 2023, do setor mineral (exceto petróleo e gás).	19
Gráfico 2 - Participação dos estados brasileiros no faturamento do setor mineral em 2023.	19
Gráfico 3 - Empregos gerados diretamente pelo setor de mineração no Brasil entre novembro de 2022 e novembro de 2023.	20
Gráfico 4 - Regressão linear da frequência de anomalias nucleares presentes em células sanguíneas de anuros com as características morfológicas dos animais(‰). Comprimento rosto coaclal em milímetros (a) e a massa em gramas (b) com destaque (elipse vermelha) dos <i>Outliers</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
AN	Outras anomalias nucleares (exceto micronúcleo)
As	Arsênio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
CRC	Comprimento rosto cloacal
CRI	Categoria de Risco
Cu	Cobre
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPA	Dano Potencial Associado
Fe	Ferro
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
LDM	Limite de Detecção do Método
MG	Minas Gerais
Mn	Manganês
MN	Micronúcleo
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
SFR	Rio São Francisco
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WMD	World Mining Data
Zn	Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1. OBJETIVOS.....	17
1.1. Objetivo	17
1.2. Objetivos Específicos	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Impactos da mineração	18
2.1.1. Impacto da mineração na economia	18
2.1.2. Impactos na saúde humana e no meio ambiente.....	21
2.2. Desastre de Brumadinho - MG	24
2.3. Anfíbios no monitoramento ambiental	25
2.4. A bacia do Rio São Francisco	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Área de estudo e amostragem.....	31
3.1.1.1. Estação Ecológica (ESEC) de Pirapitinga	32
3.1.1.2. Reservatório de Três Marias	33
3.1.1.2. Área impactada	33
3.2. Coleta e preparo de amostras de sedimento superficial.....	35
3.3. Determinação de Metais e Semimetais em amostras de sedimento	35
3.4. Coleta e identificação de anfíbios anuros	36
3.5. Extração e preparo das amostras sanguíneas	37
3.5.1. Análise de Micronúcleo (MN) e outras Anomalias Nucleares (AN)	38
3.6. Análise estatística dos dados	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Distribuição dos anfíbios ao longo da área amostrada	42
4.2. Metais e semimetais em sedimentos.....	46
4.3. Anomalias nucleares avaliadas	47
4.4. Seleção de variáveis, análises e modelos.....	51
5. CONCLUSÃO.....	55
6. RECOMENDAÇÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a extração global de minério vem crescendo significativamente, desempenhando papel fundamental no desenvolvimento econômico e social de algumas regiões (HENCKENS, 2021). No entanto, essa atividade acarreta também em grandes prejuízos ambientais aos ecossistemas locais, assim como à saúde e à segurança da população humana local (MAUS et al., 2020; DA SILVA et al., 2023). A extração e o processamento dos minérios são as principais fontes de poluição por metais e semimetais aos ambientes no entorno das áreas mineradas. Muito embora, alguns desses metais sejam considerados essenciais para o bom funcionamento dos ecossistemas, estes, quando em altas concentrações, podem causar efeitos tóxicos aos organismos expostos (SHAHMORADI, 2020; SIQUEIRA et al., 2022).

Outro fator que causa grande preocupação ambiental é o risco de desastres devido à construção de barragens para o aproveitamento dos rejeitos de minério (ISLAM, MURAKAMI, 2021). Tais barragens podem se romper, provocando impactos aos sistemas aquáticos e terrestres tanto locais, como distantes do epicentro, devido a contaminações por produtos químicos e metais tóxicos presentes no rejeito (JISKANI et al., 2020; DA SILVA et al., 2023).

Em novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de rejeitos de mineração da Mina do Fundão localizada no município de Mariana (MG). Isso causou o deslocamento de mais de 40 milhões de m³ de rejeitos de minério de ferro, afetando o canal principal do Rio Doce e parte da costa Atlântica do estado do Espírito Santo (PETESSE et al., 2023). Em 2018, houve outro evento de rompimento de barragem, o qual o mineroduto localizado no município de Santo Antônio do Grama (MG) rompeu duas vezes em menos de 20 dias, atingindo o ribeirão Santo Antônio. O primeiro rompimento despejou cerca de 300 toneladas de polpa de minério. O segundo despejou cerca de 174 toneladas e provocou a interrupção do abastecimento de água na cidade (DE MELO et al., 2021). Em janeiro de 2019, ocorreu o maior desastre ambiental brasileiro em termos de perdas humanas: o rompimento da barragem de rejeito da Mina Córrego do Feijão, localizada na região de Brumadinho (MG). Esse evento deslocou cerca de 12 milhões de m³ de rejeito de minério de ferro para o meio ambiente e causou a morte de

272 pessoas. O deslocamento do rejeito carregou solo, sedimento, plantas e outros destroços, atingindo áreas rurais e urbanas. Os sistemas terrestres e aquáticos sofreram graves impactos, em especial o riacho Ferro-Carvão e o rio Paraopeba (SIQUEIRA et al., 2022; DA SILVA et al., 2023).

A frequência e magnitude destes desastres causa preocupação não só pelos imensos prejuízos imediatos, mas também pelos danos a longo prazo nos ecossistemas afetados e na população humana local exposta (VERGILIO et al., 2021). Esses incidentes com rejeito de minério podem resultar no aumento das concentrações de metais tóxicos em rios, córregos, águas subterrâneas, solos e sedimentos.

Metais e semimetais como chumbo (Pb), mercúrio (Hg), arsênico (As) e cádmio (Cd) são tóxicos e podem ser letais para humanos e animais. Outros metais como cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn), embora sejam essenciais para seres vivos, também podem ser tóxicos quando em concentrações elevadas (SHAHMORADI et al., 2020; BUCH et al., 2021). Alguns desses metais persistem no ambiente e no organismo por muito tempo, fazendo com que permaneçam em caráter cumulativo ao longo da cadeia alimentar. A bioacumulação destes elementos pode ocorrer nos animais e nas plantas que estão em contato direto com a área afetada, assim como, de forma indireta nos seres humanos que consomem essas plantas, animais e de forma direta com o consumo de água contaminada (FUENTES et al., 2020; OSMAN et al., 2021).

A constante exposição e a característica cumulativa desses contaminantes podem causar severos agravos a saúde de organismos expostos, como seres humanos, anfíbios e peixes (HU et al., 2021; OSMAN et al., 2021; SINGH et al., 2021; CRUZ-ESQUIVEL et al., 2023). Entre os efeitos observados estão alterações na pressão arterial; disfunções hepáticas; pulmonares e renais; deficiência no sistema imunológico; e em alguns casos aumentar a probabilidade do desenvolvimento de câncer, devido aos efeitos danosos desses metais e semimetais ao material genético das células (OSMAN et al., 2021; SINGH et al., 2021). Sendo assim, faz-se necessário o monitoramento a longo prazo dos ecossistemas atingidos por esse tipo de poluente a fim de assegurar um ambiente ecologicamente equilibrado, e assim garantir a segurança hídrica e alimentar da população que depende destes recursos para sobreviver nas áreas atingidas (FUENTES et al., 2020; VERGILIO et al., 2021; OSMAN et al., 2021).

Uma das formas de mensurar o impacto de tais eventos aos ecossistemas locais é o biomonitoramento ativo, que consiste no monitoramento de organismos vivos que habitam a área de estudo. Dessa forma, pode-se melhor avaliar a qualidade do ambiente e as mudanças ocorridas nele (GIROTTI et al., 2020; ABAS et al., 2021).

Um dos biomarcadores mais amplamente estudados em danos ao DNA e instabilidade cromossômica nas células é o micronúcleo (MN). Os MNs se originam de fragmentos cromossômicos que não são incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular (FENECH et al., 2020). O teste de MN é vantajoso por ser pouco evasivo, acessível e de custo relativamente baixo (FENECH et al., 2020; LAFFON et al., 2021; AL-SALMAN et al., 2022).

A escolha do organismo ideal a ser monitorado é complexa e deve levar alguns pontos em consideração, tais como: solidez taxonômica (distribuição ampla), baixa mobilidade (reflete as condições locais), características ecológicas bem conhecidas, adequação para experimentos de laboratório (alta sensibilidade a estressores ambientais e antropogênicos) e características de quantificação e padronização (AGUILAR et al., 2022).

Neste sentido, os anfíbios são organismos amplamente utilizados no biomonitoramento, já que a maioria tem um ciclo de vida bifásico, habitando ecossistemas de água doce e terrestres. Ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos e são considerados vulneráveis a distúrbios ambientais devido à sua pele permeável (MITKOVSKA et al., 2021; CHEN et al., 2023; ORTON et al., 2023). Estes também podem ser suscetíveis a malformações esqueléticas (VÁZQUEZ et al. 2023). Além disso, sua exposição a metais tóxicos pode provocar outras malformações, como: problemas nos olhos, na pigmentação e na mandíbula, além de gerar anormalidades nucleares (BOSCH et al., 2020; LEHR et al., 2021; MITKOVSKA et al., 2021; VÁZQUEZ et al. 2023). Dessa forma, os anfíbios tornam-se bons candidatos a bioindicadores para a realização da presente pesquisa de monitoramento em uma área afetada pelo rompimento da barragem de rejeitos de mineração.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares (AN) em eritrócitos de anfíbios que habitavam as proximidades do rio Paraopeba, após 3 anos do rompimento da barragem de rejeitos de mineração.

1.2. Objetivos Específicos

- Coletar e analisar o material sanguíneo dos organismos capturados, a fim de se avaliar a frequência de micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (AN).
- Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos da presença dos metais e semimetais em sedimentos em relação a frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares nas células sanguíneas dos organismos capturados.
- Verificar quais das variáveis avaliadas podem estar influenciando na frequência de MN e NA nas diferentes espécies de anfíbios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Impactos da mineração

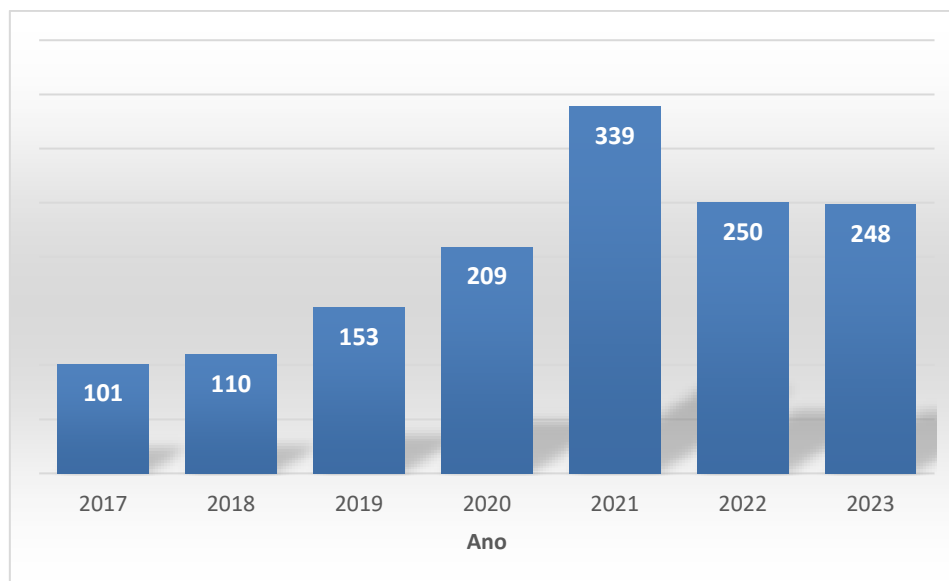
2.1.1. Impacto da mineração na economia

A mineração desempenha um papel fundamental na economia global, fornecendo recursos essenciais para o funcionamento dos setores de produção (LITVINENKO et al., 2020). Sendo responsável não só pela obtenção de metais preciosos, como ouro e prata, mas também, de materiais indispensáveis para a operação da indústria, como ferro, cobre e carvão (LUCKENEDER et al., 2021). Além disso, essa atividade também é responsável pela geração de empregos diretos e indiretos, impulsionando o desenvolvimento econômico tanto em áreas rurais quanto urbanas (ALVES et al., 2021). Contudo, a mineração global vem crescendo a um ritmo acelerado nas últimas décadas, causando diversos problemas sociais e impactos ambientais em todo o mundo (MAUS et al., 2020; LUCKENEDER et al., 2021). Em alguns casos, os danos podem ser irreversíveis, como a destruição de ecossistemas; contaminação do solo e das águas; comprometimento da saúde das comunidades locais; e provocando o deslocamento ou a extinção de algumas populações de organismos e animais (ALVES et al., 2021; BOLDY et al., 2021).

De acordo com a World Mining Data (WMD, 2023), em 2021 a mineração mundial extraiu mais de 17,9 bilhões de toneladas de produtos de mineração. Houve um aumento de 58,4% em comparação ao ano 2000 com 11,3 bilhões de toneladas e um aumento de 86,45% se comparado ao ano de 1985. O Brasil está entre os países que mais mineram no mundo, onde em 2021, ocupou o sétimo lugar no ranking mundial extraindo mais de 500 milhões de toneladas de produtos de mineração (WMD, 2023). Destes, mais de 273 milhões de toneladas foram de ferro, fazendo com que o Brasil ocupasse o segundo lugar no ranking de extração de ferro, ficando atrás apenas da Austrália que extraiu cerca de 570 milhões de toneladas (WMD, 2023).

Em 2023, o Brasil exportou cerca de 392 milhões de toneladas de produtos do setor mineral, correspondendo a um aumento de 9,5% em relação a 2022. Deste montante, o minério de ferro foi responsável por 71% das exportações. Neste mesmo ano o Brasil faturou cerca de R\$ 248,2 bilhões (excluindo-se petróleo e gás) no setor mineral (Gráfico 1) (IBRAM, 2023).

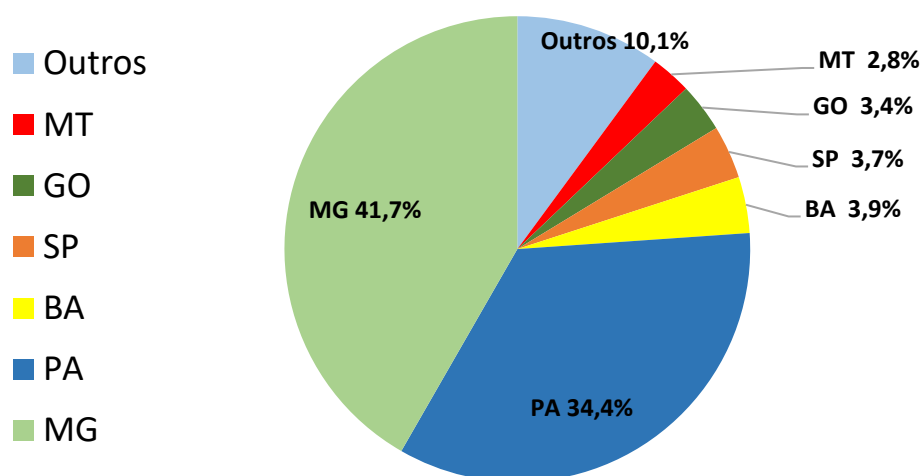
Gráfico 1 - Faturamento anual do Brasil (em bilhões de reais), entre os anos de 2017 e 2023, do setor mineral (exceto petróleo e gás).



Fonte: IBRAM, 2023.

Os estados de Minas Gerais (MG) e Pará (PA) tiveram as maiores participações no faturamento de 2023, de 41,7% e 34,4%, respectivamente. Em seguida, os estados da Bahia (BA), São Paulo (SP), Goiás (GO) e Mato Grosso (MT) tiveram participação no faturamento de, respectivamente, 3,9%, 3,7%, 3,4%, e 2,8%. Os outros estados somaram 10,1% de participação (Gráfico 2). A arrecadação da Compensação Financeira pela Exportação Mineral (CFEM) totalizou R\$ 6,86 bilhões (IBRAM, 2023).

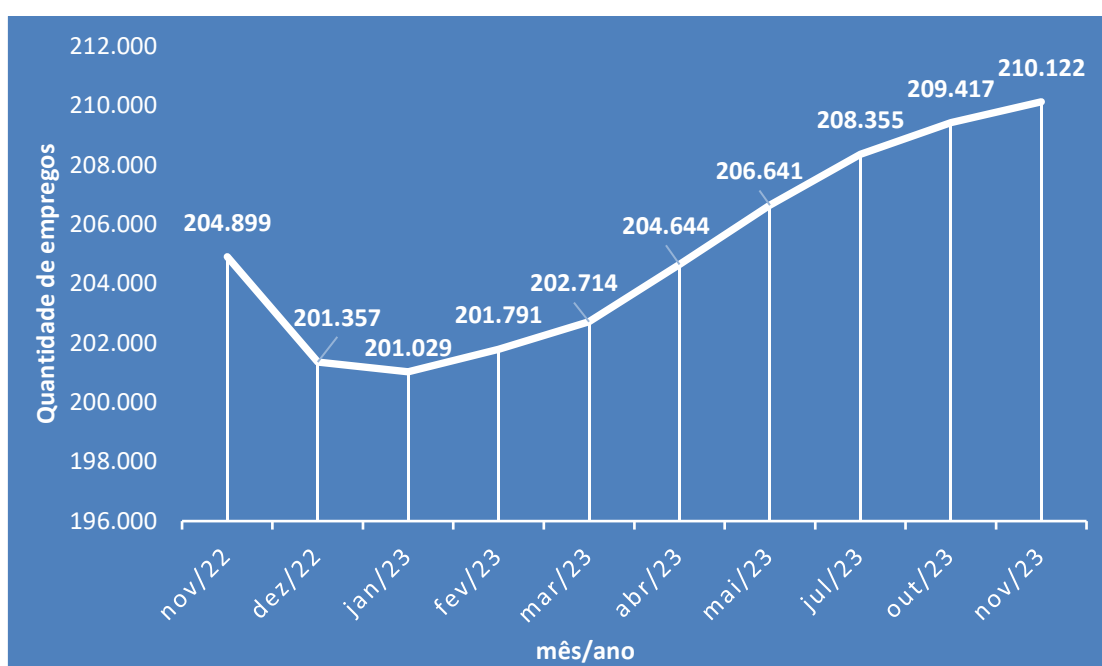
Gráfico 2 - Participação dos estados brasileiros no faturamento do setor mineral em 2023.



Fonte: IBRAM, 2023.

Ainda segundo o Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM, 2023), o setor mineral gerou mais de 210 mil empregos diretos e mais de 2,5 milhões de empregos ao longo da cadeia e mercado no ano de 2023. Mais de 9.000 vagas foram geradas entre janeiro e novembro de 2023 (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Empregos gerados diretamente pelo setor de mineração no Brasil entre novembro de 2022 e novembro de 2023.



Fonte: Adaptado de IBRAM, 2023.

Considerando, a necessidade dos produtos provenientes da extração para a manutenção e crescimento da sociedade e a participação da mineração na obtenção de recursos financeiros e geração de empregos, é nítida a importância da atividade mineradora tanto no cenário nacional quanto global (LUCKENEDER et al., 2021; WORLANYO & JIANGFENG, 2021). É esperado que essas atividades se intensifiquem o que implica na expansão física dos locais de mineração existentes e na intensificação do processo de extração. Isso alerta para o aumento dos impactos associados a este tipo de atividade no futuro (LUCKENEDER et al., 2021).

Dessa forma, a mineração desempenha uma função ambivalente para a sociedade. Sendo indispensável para o modelo de crescimento econômico atual, mas, por outro lado, está entre as atividades humanas mais danosas considerando o aspecto ambiental e social (LUCKENEDER et al., 2021).

2.1.2. Impactos na saúde humana e no meio ambiente

De acordo com a literatura, a mineração pode provocar uma série de danos sobre a saúde humana e do ecossistema (AGBOOLA et al., 2020). As matrizes aquáticas e terrestres podem sofrer impactos quanto ao desmatamento, liberação de metais e semimetais tóxicos e drenagem ácida. O ar também pode ser contaminado pela liberação de poluentes atmosféricos (como o mercúrio) e dispersão de partículas do material de rejeito ou minério, podendo contaminar o local e áreas adjacentes (DE LACERDA, 2003; CACHADA et al., 2018). Essas ocorrências provenientes da atividade mineradora podem resultar na intoxicação da fauna e flora locais, acarretando perda da biodiversidade e representando riscos para a segurança hídrica e alimentar da população local (CACHADA et al., 2018; AGBOOLA et al., 2020). Além disso, devido as atividades perigosas associadas e risco potencial de desastres, essa atividade também envolve riscos para a saúde e integridade física dos funcionários, bem como para a população que reside nas proximidades (LOREDO, 2006; AGBOOLA et al., 2020; OWEN, et al. 2020; GENDLER & PROKHOROVA, 2021).

A mineração pode causar danos ao solo, como mudanças na topografia do local, devido ao desmatamento da vegetação e a extração e movimentação do solo (WILSON, 2019; ZHANG & WANG, 2020). Na Amazônia brasileira, por exemplo, entre os anos de 2005 e 2015, as atividades de mineração provocaram desmatamento em uma área de 11.670 km². Essa extensão representa 9% de toda a perda de floresta amazônica durante esse período (SONTER et al., 2017).

A mineração é uma das principais causas de contaminação terrestre por substâncias tóxicas (como metais e semimetais), não apenas devido às operações atuais, mas também aos efeitos duradouros de locais contaminados no passado (CHENG et al. 2015; CACHADA et al., 2018). Um exemplo disso é o caso de uma mina abandonada a céu aberto em Kokkinopezoula (Chipre, União Europeia). Durante a investigação do local foram realizadas coletas de 32 amostras de solo em diferentes pontos da área. Essas

amostras apresentaram elevadas concentrações de metais, como: ferro (4,85wt% – 23,7wt%), manganês (11–3.800 ppm), cobre (57,5–1.095 ppm), zinco (11–1.170 ppm) e cromo (2–142 ppm) (KOSTARELOS et al., 2015).

Além disso, o acúmulo de metais tóxicos no solo pode impactar o desenvolvimento da vegetação superficial (YANG et al., 2020; ZHANG & WANG, 2020). Ou seja, além da área desmatada para o estabelecimento da atividade mineradora, também pode haver redução da vegetação pela contaminação do solo, agravando o processo de erosão (ZHANG & WANG, 2020).

Essas atividades também afetam os recursos hídricos, como por exemplo, na Amazônia, onde estima-se que de 3 a 4 mil toneladas de mercúrio (Hg) foram depositadas em sua bacia devido às atividades de mineração de ouro entre os anos de 1980 e 1990 (DE LACERDA, 2003). Outro caso de grande preocupação ocorre na província de Yunnan, na China, mais especificamente na região de mineração de Zhehai. Esta área possui 2,7 milhões de toneladas de resíduos de cádmio e zinco, identificados como fonte de metais tóxicos que representam uma séria ameaça à segurança das águas subterrâneas locais (ZHAO et al., 2019).

Além de tudo, ainda existe a preocupação com a transferência de elementos tóxicos do solo e da água para a cadeia alimentar, representando um risco para a saúde humana e a sustentabilidade a longo prazo da produção de alimentos (CACHADA et al., 2018). Um estudo recente analisou os efeitos na saúde das famílias que residem próximas a áreas industriais e mineradoras poluídas em França, Portugal e Espanha, constatando impactos como baixo peso ao nascer, saúde infantil comprometida e aumento de doenças crônicas em adultos (LEVASSEUR et al., 2021). Além disso, verificou-se maior abandono escolar e demanda por serviços de saúde, especialmente em famílias de baixa renda e com menor escolaridade, ressaltando sua vulnerabilidade à poluição (LEVASSEUR et al., 2021). Um outro estudo relatou concentrações mais elevadas de chumbo e cádmio no sangue de crianças que residem próximas a refinarias de metal na Renânia do Norte-Vestefália, em comparação com crianças de outras regiões (WILHELM et al., 2005).

O risco de desastres é outro fator preocupante nas áreas de mineração e com o passar dos anos esse risco vem aumentando. Embora não exista um registro global oficial de barragens, é possível acessar vários bancos de dados que capturam informações

divulgadas sobre desastres com rejeitos. Esses bancos de dados disponibilizam informações como: a localização, as causas da falha, volumes descarregados e consequências sociais e ambientais (OWEN, et al. 2020).

Segundo Vogel (2013), a taxa de falhas em barragens de rejeitos aumentou para uma frequência de cinco a seis falhas significativas anualmente após o ano 2000. Cada evento de falha causa danos extensos ao ambiente local e, em casos catastróficos, resulta na perda de vidas humanas. Estima-se que entre 1961 e 2019, pelo menos 2.375 pessoas perderam a vida em desastres envolvendo barragens de rejeitos em todo o mundo (WISE, 2024).

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Segurança de Barragens (SNISB) o Brasil possui 614 barragens de rejeito de mineração. Dessas, 52 são classificadas como alto risco na Categoria de Risco (CRI) - determinada pelas características construtivas e de conservação da barragem. E 192 são classificadas como alto risco de Dano Potencial Associado (DPA) - indica a magnitude do dano que ela pode causar se vier a romper (SNISB, 2024).

Essas barragens de rejeitos são utilizadas principalmente pela indústria de mineração para o armazenamento dos rejeitos resultantes do processo de extração mineral. Embora nem todas essas barragens representem um alto risco de rompimento, é essencial monitorar e garantir a segurança de todas as estruturas para prevenir desastres como os ocorridos em Mariana (2015) e Brumadinho (2019), que trouxeram graves consequências para o meio ambiente e as comunidades locais (OWEN, et al. 2020; THOMPSON, et al., 2020; VERGILIO et al., 2021).

O rompimento da barragem de Brumadinho também levantou sérias questões sobre a segurança das estruturas de mineração no Brasil e a responsabilidade das empresas do setor. O desastre de Brumadinho provocou debates sobre regulamentações mais rigorosas para a indústria de mineração e a necessidade de garantir a segurança das comunidades próximas a barragens de rejeitos (JACOBI et al., 2019; SILVA et al., 2023).

Esses impactos são amplamente documentados na literatura científica e demonstram a importância de práticas de mineração responsáveis e regulamentadas, bem como de monitoramento ambiental rigoroso para mitigar os impactos negativos sobre o

ecossistema (CACHADA et al., 2018; JACOBI et al., 2019; AGBOOLA et al., 2020; OWEN, et al. 2020).

2.2. Desastre de Brumadinho - MG

O rompimento da barragem de Brumadinho, ocorrido em 25 de janeiro de 2019, foi um dos piores desastres ambientais da história do Brasil. A barragem continha rejeitos de mineração, principalmente de ferro, e se rompeu na região de Córrego do Feijão, município de Brumadinho, Minas Gerais. Este desastre resultou em centenas de mortes, além de causar graves danos ambientais e socioeconômicos (SIQUEIRA et al., 2022; DA SILVA et al., 2023).

Estima-se que este evento deslocou cerca de 12 milhões de m³ de rejeito de minério de ferro ao longo da bacia do rio Paraopeba (SIQUEIRA et al., 2022). Essa lama tóxica atingiu áreas residenciais, instalações industriais, plantações, rios e matas ciliares, contaminando corpos d'água e sistemas terrestres, causando danos à fauna e flora locais (SOS MATA ATLÂNTICA, 2019; PARENTE et al., 2021; SIQUEIRA et al., 2022; DA SILVA et al., 2023). Além disso, de acordo com a Assembleia Legislativa de Minas Gerais (2024) esse desastre provocou a morte de 272 pessoas.

O desastre também teve impactos severos no Rio Paraopeba, afetando significativamente a população que depende dos recursos providos por ele (PEIXOTO et al., 2022; SOS MATA ATLÂNTICA, 2019). A lama proveniente do rompimento da barragem carregava uma série de substâncias potencialmente tóxicas, incluindo altas concentrações de metais como ferro, manganês e alumínio (PARENTE et al., 2021). Essa contaminação teve um impacto imediato na qualidade da água do Rio Paraopeba, tornando-a imprópria para usos, em especial para abastecimento público, irrigação e dessedentação de animais (SOS MATA ATLÂNTICA, 2019; ROTTA, 2020).

As alterações nas características físico-químicas do rio, como o aumento da turbidez e presença de substâncias potencialmente tóxicas, afetaram diretamente a saúde e a sobrevivência da vida aquática na região, resultando na morte de peixes e outros organismos aquáticos no local. (JACOBI et al., 2019; SOS MATA ATLÂNTICA, 2019; THOMPSON et al., 2020). Assim, a contaminação do rio teve um impacto severo na atividade pesqueira regional, comprometendo a economia local (PEIXOTO et al., 2022). Além disso, a poluição da água afetou adversamente outras atividades econômicas

relacionadas ao rio, como o turismo e a agricultura (SOS MATA ATLÂNTICA, 2019; PEIXOTO et al., 2022).

Esse desastre representou também sério risco à saúde das comunidades locais que dependem da água para consumo, irrigação e outras necessidades básicas (SOS MATA ATLÂNTICA, 2019; ROTTA et al., 2020). A exposição a metais tóxicos e outras substâncias químicas tóxicas pode causar uma série de problemas de saúde, incluindo desregulação endócrina, toxicidade renal, osteoporose, desenvolvimento de doenças caceriogênicas e outras doenças graves (VIGNERI et al., 2017; PARENTE et al., 2021; LIU et al., 2023; EEA, 2024).

O Brasil enfrentou vários desastres relacionados ao rompimento de barragens de rejeitos de mineração, como os trágicos eventos de Mariana (2015) e Brumadinho (2019), que destacaram a importância da segurança e da regulamentação adequada das barragens (OWEN, et al. 2020). Após esses desastres, houve um aumento na atenção e na fiscalização das barragens de rejeitos no Brasil, com esforços para melhorar os padrões de segurança, a gestão de riscos. Porém ainda é necessário ampliar a transparência das informações sobre potenciais riscos de desastres a todas as partes interessadas (SILVA et al., 2023).

2.3. Anfíbios no monitoramento ambiental

Alguns grupos de organismos são utilizados como bioindicadores por apresentarem funções ecológicas importantes aos ecossistemas e interações com os meios bióticos e abióticos (DA SILVA et al., 2023). Além de também acumularem vestígios de substâncias tóxicas em todo o seu corpo, o que pode apresentar efeitos deletérios associados à essa exposição (ZOCHE et al., 2014). Os anfíbios, por exemplo, são organismos que podem ser considerados como sensíveis para detectar agentes genotóxicos. Isto se deve muito por algumas características apresentadas em seu ciclo de vida complexo que alterna fases de vida aquática e terrestre e principalmente de sua pele permeável e úmida (em função da respiração cutânea) (YOUNG et al. 2004; POLLO et al., 2015; ESTES-ZUMPF, et al. 2022).

Algumas avaliações podem ser realizadas para detectar anormalidades nos anfíbios e indicar contaminação do ambiente, como: anormalidades morfológicas, comportamento anormal, taxa de sobrevivência reduzida e anomalias hematológicas

(POLLO et al., 2015; BOSCH et al., 2020; CUZZIOL et al. 2020; LEHR et al., 2021; MITKOVSKA et al., 2021).

Além disso, existem estudos de efeitos de exposição a metais em anfíbios de diferentes espécies. Esses estudos apresentam dados relativos ao aumento na concentração dos metais e no tempo de exposição, resultando em taxas mais altas de mortalidade. No entanto, há também uma considerável variação entre as espécies em relação a sua sensibilidade aos diferentes metais e semimetais (WEI et al., 2015).

O estudo de anomalias nucleares em eritrócitos de anfíbios é uma área relativamente recente de pesquisa, apesar disso, essa análise é uma ferramenta estabelecida e amplamente utilizada em estudos de biomonitoramento e avaliação de riscos ambientais (POLLO et al., 2015). A análise da frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares em eritrócitos de anfíbios pode fornecer informações importantes sobre o nível de exposição a contaminantes genotóxicos e o potencial dano genético em populações locais (YOUNG et al. 2004; POLLO et al., 2015). Sendo assim, duas possíveis causas foram reconhecidas: (1) um agente genotóxico gera lesões no DNA ou (2) excesso de material pode provocar instabilidade genômica, sendo este removido do núcleo principal por meio da formação de um micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (AN) (POLLO et al., 2015). Dessa forma, essa técnica desempenha um papel fundamental na avaliação da saúde ambiental de habitats aquáticos e terrestres e na identificação de áreas afetadas pela contaminação ambiental, contribuindo para a conservação da biodiversidade e a proteção da saúde humana (YOUNG et al. 2004; POLLO et al., 2015).

Nos últimos anos, pesquisadores em diferentes partes do mundo têm conduzido estudos ecológicos para avaliar o acúmulo de elementos potencialmente prejudiciais nos tecidos de anuros, especialmente em regiões afetadas pela mineração e agricultura (ROCHA et al., 2022). No Brasil, alguns estudos investigaram o acúmulo e os efeitos desses elementos em anuros selvagens; entretanto, apenas alguns deles foram publicados em periódicos científicos revisados por especialistas (ROCHA et al., 2022). Fígado, rins e músculo esquelético foram os tecidos mais frequentemente examinados, seguidos por ossos longos, pele e intestino. Na maioria dos estudos, esses órgãos foram analisados separadamente, enquanto a análise da carcaça como um todo foi raramente realizada (ROCHA et al., 2022).

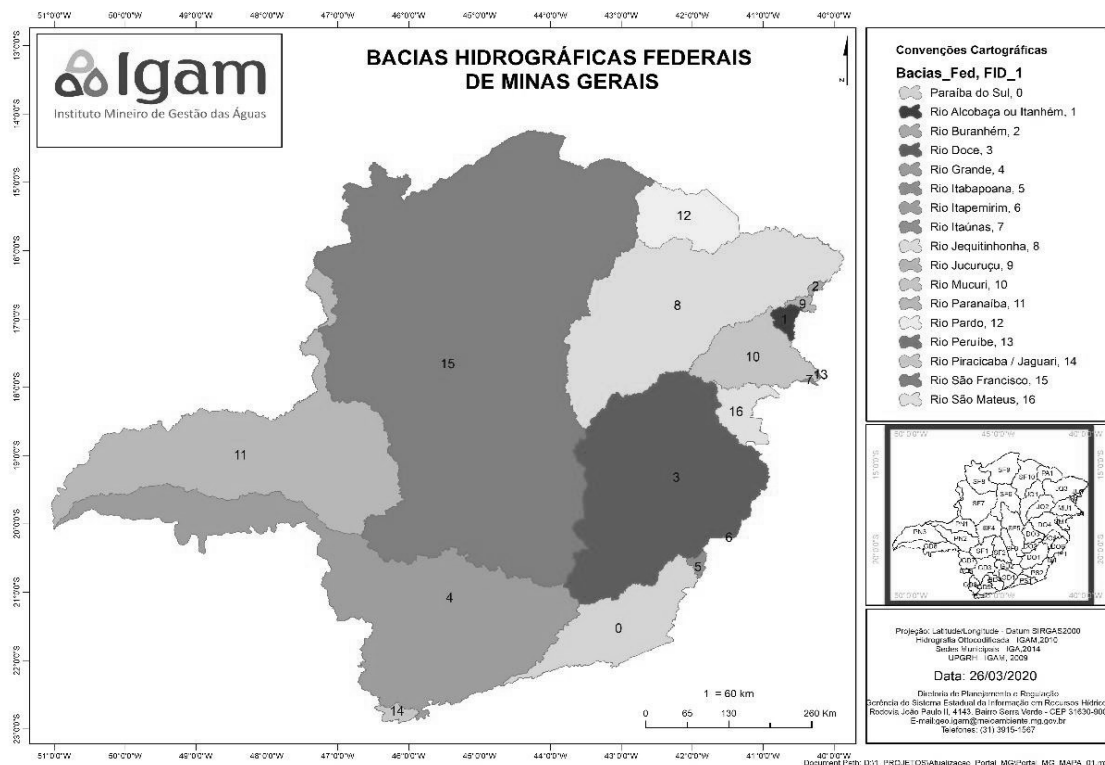
Os anfíbios anuros podem ser considerados como organismos sensíveis, versáteis e eficientes como indicadores biológicos, auxiliando na avaliação e mitigação dos efeitos das atividades humanas nos ecossistemas (BOSCH et al., 2020; LEHR et al., 2021; MITKOVSKA et al.). O monitoramento destes organismos pode oferecer informações cruciais sobre a saúde ambiental de regiões afetadas pela mineração e outras atividades poluidoras. No entanto, há uma necessidade premente de maior divulgação de estudos com dados sólidos e confiáveis (ZOCHE et al., 2014; ROCHA et al., 2022).

2.4. A bacia do Rio São Francisco

Minas Gerais é conhecido pela relevância de seus corpos hídricos que estão divididos em 17 bacias hidrográficas (Figura 1) e representam 8,3% dos rios e lagos naturais e artificiais do Brasil (SEMAD, 2024). Dentre as 17 bacias, destaca-se a do Rio São Francisco por sua extensão de 2.863 km e uma área de drenagem de mais de 639.219 km², correspondendo a 8% do território nacional (CBHSF, 2024;).

A bacia do Rio São Francisco abrange uma vasta extensão que se estende desde Minas Gerais, onde o rio tem sua nascente na Serra da Canastra. Ele atravessa 505 municípios distribuídos por seis estados (Minas Gerais, Goiás, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe), além do Distrito Federal. Sua foz está no Oceano Atlântico, na divisa entre os estados de Alagoas e Sergipe (CBHSF, 2024).

Figura 1 - Bacias Hidrográficas de Minas Gerais. Bacia do Rio São Francisco (15) em MG.



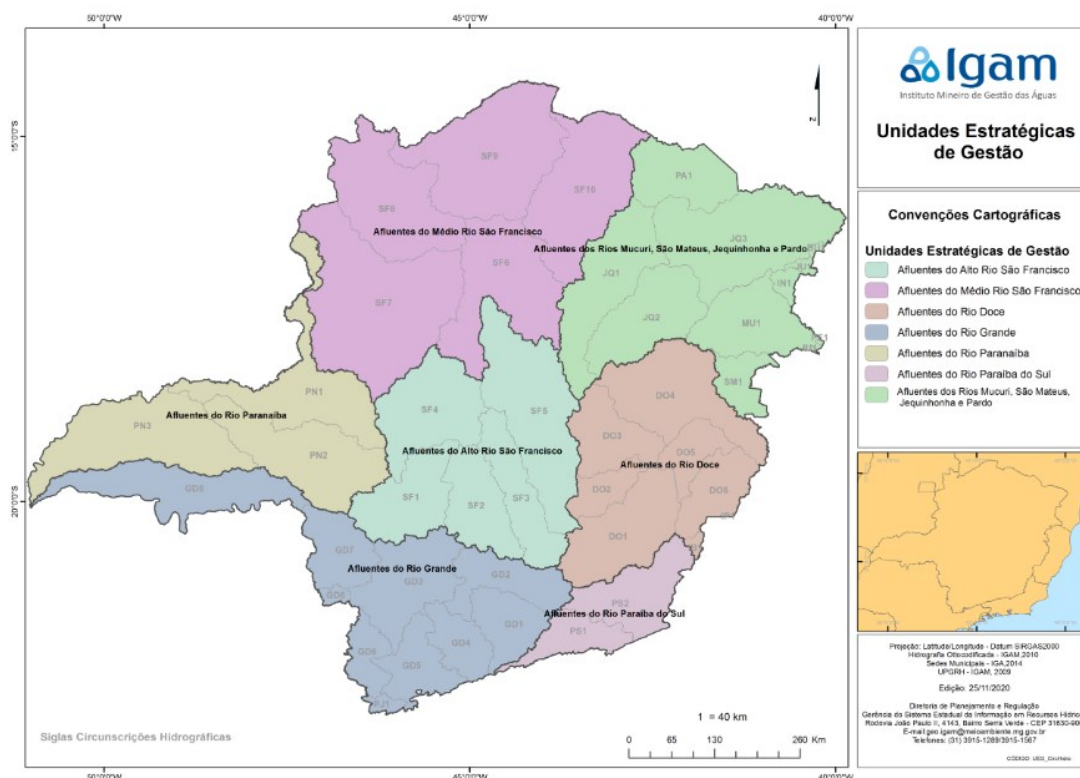
Fonte: Adaptado de IGAM, 2024.

Reconhecida como uma das 12 regiões hidrográficas do Brasil, a bacia do Rio São Francisco foi subdividida em quatro zonas ou regiões fisiográficas para fins de planejamento: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco. Com uma população estimada em mais de 15 milhões de habitantes, a maior densidade demográfica concentra-se na região do Alto São Francisco (CBHSF, 2024). Os afluentes do Alto e Médio Rio São Francisco estão localizados no estado de Minas Gerais (Figura 2) (IGAM, 2024).

De acordo com o Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (2024), mais da metade (cerca de 54%) do território da bacia hidrográfica está localizada no Semiárido, sujeito a períodos críticos de estiagem. No entanto, a região apresenta uma significativa diversidade ambiental, englobando quatro biomas distintos: Caatinga, Cerrado, fragmentos de Mata Atlântica e o ecossistema estuarino do rio. Entre os principais reservatórios presentes ao longo do rio São Francisco, utilizados para o controle de vazão e/ou geração de energia hidroelétrica, destacam-se: Três Marias, em Minas Gerais;

Sobradinho, Paulo Afonso e Itaparica, na Bahia; e Xingó, situado entre os estados de Alagoas e Sergipe.

Figura 2 - Unidades Estratégicas de Gestão das águas em Minas Gerais.



Fonte: Adaptado de IGAM, 2024.

A nascente do rio Paraopeba está localizada ao sul no município de Cristiano Ottoni e sua foz está na represa de Três Marias, no município de Felixlândia, ambos em Minas Gerais. Essa bacia hidrográfica compreende 48 municípios (Figura 3) somando 1.318.885 habitantes (IBGE 2010), sendo 1.226.625 de população urbana e 92.260 de população rural (CBHSF, 2024). A Bacia Hidrográfica do Rio Paraopeba (Figura 3) situa-se a sudeste do estado de Minas Gerais e compreende uma área de 12.054,25 km² que corresponde a 5,14% do território da bacia do rio São Francisco e 2,5% da área total do estado de Minas Gerais. E seus principais rios são: Paraopeba, Águas Claras, Macaúbas, Betim, Camapuã e Manso (CBHSF, 2024).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e amostragem

O Rio Paraopeba (Figura 4) é um dos principais afluentes do Rio São Francisco e tem uma área de drenagem de aproximadamente 12 mil km². Uma parte de suas dimensões está situada em uma zona de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado (Figura 5) (MONTEIRO, 2022).

Figura 4 - Rio Paraopeba em Minas Gerais - MG no ponto M28 (latitude -20,259357, longitude -44,122472) no dia 3 de agosto de 2023.



Fonte: A autora.

O Rio Paraopeba tem sofrido impactos contínuos e prejudiciais devido às atividades agrícolas e de mineração, além das atividades urbanas e do despejo de efluente doméstico, principalmente do córrego Betim. Recentemente, o rio foi gravemente afetado por um incidente de grande proporção: o rompimento da barragem de rejeitos na mina de minério de ferro Córrego do Feijão (PARENTE et al., 2022; FREITAS et al., 2023).

Os dados utilizados no presente trabalho foram coletados durante 3 campanhas durante os anos de 2022 e 2023, sendo 2 campanhas no período chuvosos e 1 campanha no período seco. Um total de 23 pontos foram amostrados ao longo das margens do Rio

Paraopeba para coleta de anfíbios (Tabela 1). Dentre eles: 11 pontos controle, sendo 7 a montante da área contaminada e 4 a jusante; e 12 pontos da área impactada ao longo das margens do rio Paraopeba.

Tabela 1 - Nomenclatura dos pontos de amostragem com sua respectiva localização (latitude e longitude) e classificação da área em: Controle (C) e Impactada (I).

Ponto de coleta	latitude	longitude	Classificação
M45	-20,300811	-44,094197	C
M28	-20,259357	-44,122472	C
M24	-20,247465	-44,139789	C
M16	-20,234281	-44,123472	C
M14	-20,221617	-44,111060	C
M6	-20,189322	-44,150835	C
M4	-20,175089	-44,149092	C
J4	-20,146801	-44,186683	I
J17	-20,084594	-44,208933	I
J24	-20,043071	-44,206861	I
J40	-20,004794	-44,257158	I
J42	-19,999383	-44,271035	I
J46	-19,970640	-44,277870	I
J60	-19,914970	-44,351990	I
J106	-19,706540	-44,471130	I
J173	-19,451850	-44,581630	I
J190	-19,356737	-44,545235	I
J251	-19,136740	-44,685000	I
J294	-18,972150	-44,792833	I
J314	-18,863790	-44,797080	C
J446	-18,384154	-45,324585	C
J447	-18,377656	-45,309736	C
J453	-18,359652	-45,332479	C

3.1.2.1. Áreas controle a montante a jusante

A montante da área impactada foram coletadas amostras de anfíbios em 7 pontos diferentes (M45, M28, M24, M16, M14, M6 e M4). Já a jusante do desastre, foram selecionadas 2 áreas controles (ESEC de Pirapitinga e o reservatório de três Marias) devido aos potenciais impactos causados por atividades mineradoras na área controle a montante que poderiam causar possíveis confusões no controle dos dados.

3.1.1.1.1. Estação Ecológica (ESEC) de Pirapitinga

A ESEC de Pirapitinga é uma unidade de conservação que está localizada no estado de Minas Gerais, no leito do rio São Francisco. Fundada em julho de 1987, ela

corresponde a uma ilha artificial, criada pela Usina Hidrelétrica de Três Marias e ocupa uma área de 1.384,50 hectares (ICMBIO, 2024).

Ela tem a missão de preservar uma amostra do bioma Cerrado e contribuir para a manutenção da viabilidade ecológica de populações de fauna e flora associadas à ilha, em longo prazo. Além disso, a ESEC de Pirapitinga também é responsável pela proteção de espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção no Estado de Minas Gerais (ICMBIO, 2013).

Devido à sua missão de preservação e à sua localização no leito do rio São Francisco, a área da ESEC de Pirapitinga foi selecionada como uma área de controle a jusante do rompimento da barragem. Na ESEC, as coletas foram realizadas em três pontos distintos: J446, J447 e J453 (Figura 5). Entretanto, para efeitos de análise, os indivíduos coletados nesses pontos foram tratados como pertencentes a um único ponto.

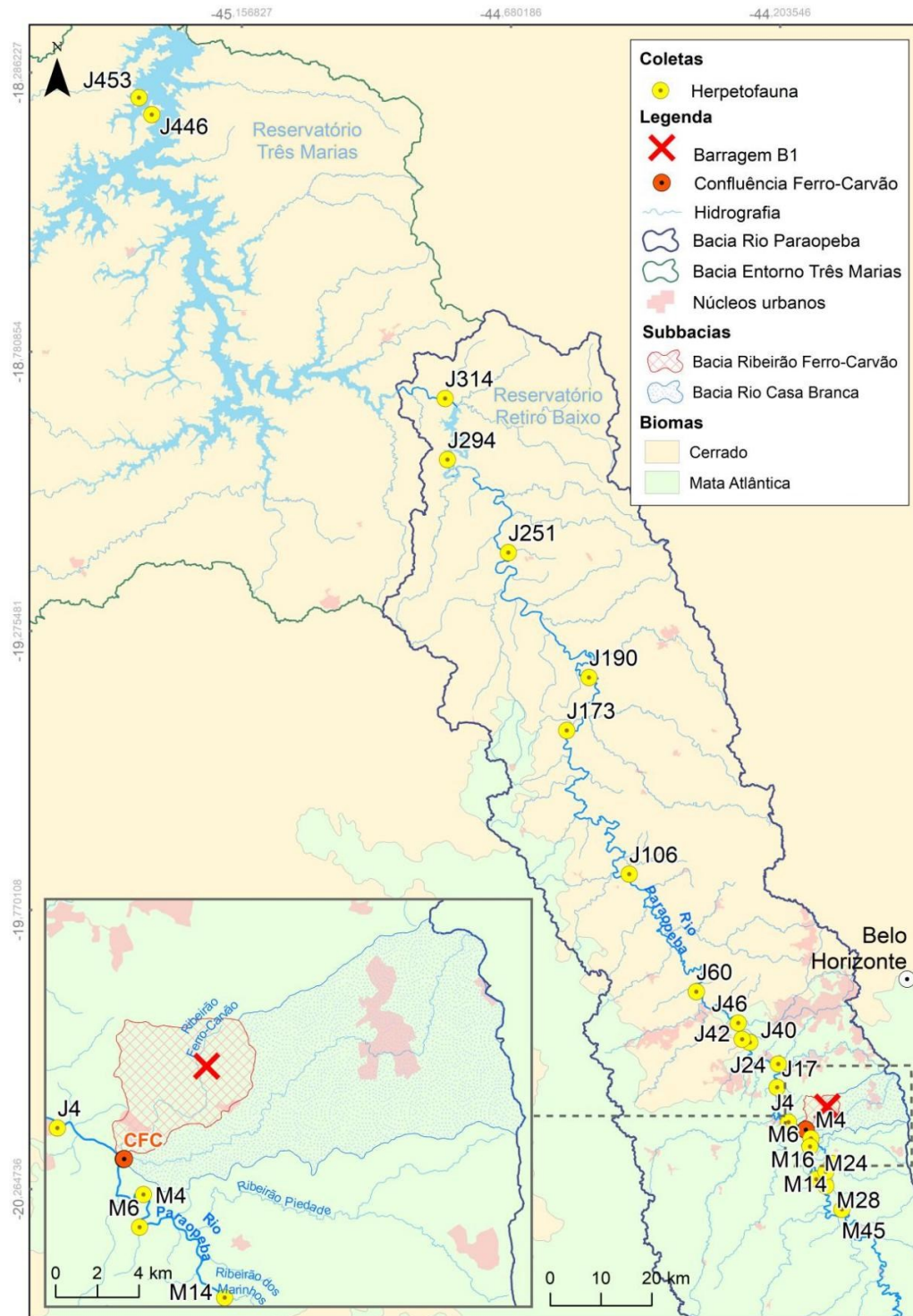
3.1.1.1.2. Reservatório de Três Marias

O reservatório de Três Marias (Figura 5), situado na região norte de Minas Gerais, abrange uma área de 1090 km² e integra a bacia hidrográfica do rio São Francisco, com o rio Paraopeba como um dos seus principais afluentes. Neste estudo, o reservatório foi designado como uma área de controle, considerando retenção dos rejeitos a montante (MONTEIRO, 2022).

3.1.1.2. Área impactada

A área impactada foi considerada a extensão do rio Paraopeba atingida pelo rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem Brumadinho no ano de 2019. Nesta área foram coletados anfíbios em 12 pontos diferentes (J4, J17, J24, J40, J42, J46, J60, J106, J173, J190, J251 e J294). O ponto J294, localizado no Reservatório de Retiro Baixo (Figura 5), desempenha um papel fundamental na dinâmica de contaminação proveniente do desastre, considerando as evidências de retenção do rejeito neste reservatório (FERNANDES, 2021; MONTEIRO, 2022).

Figura 5 - Mapa da Bacia do Rio Paraopeba com as marcações dos pontos de coleta (Herpetofauna), local do desastre (Barragem B1) e ponto do Ribeirão Ferro-Carvão com o Rio Paraopeba (Confluência Ferro-Carvão).



Fonte: A autora.

3.2. Coleta e preparo de amostras de sedimento superficial

Estas amostragens foram realizadas por outras equipes do Projeto Estudo sobre a Biota Aquática e Comunidades Ripárias no Rio Paraopeba e analisadas no Laboratório de Radioisótopos do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O esforço amostral para coleta de sedimento superficial ao longo do Rio Paraopeba, incluiu 18 pontos: 5 pontos a montante do ponto de confluência com o Ribeirão Ferro-Carvão, 5 pontos a jusante deste ponto, 5 pontos a jusante do Rio Betim e 3 pontos nos Reservatórios (Retiro Baixo, a jusante de Retiro Baixo e Três Marias).

O sedimento superficial (até 15 cm de profundidade) foi coletado, com auxílio de um coletor de polipropileno, em pontos marginais ao longo do rio e nos reservatórios (NGUYEN et al., 2016). As amostras foram armazenadas em um saco de polietileno, catalogadas e preservadas a -20 °C no laboratório de campo, para posterior análise de metais.

As amostras de sedimento superficial foram peneiradas em malha de aço para separação de partículas menores do que 75 µm. A extração dos metais foi realizada em um tubo cônico de polipropileno (Falcon) com capacidade para 50 mL, consistindo na adição de 30 mL de solução extratora (HCl 0,1 M) em aproximadamente 3,0 g de amostra. Após 16 horas a solução foi centrifugada (05 min/3000 rpm) para posterior determinação (FISZMAN et al., 1984). Para a extração do semimetal, arsênio (As), foram usadas alíquotas de aproximadamente 0,1 g p.s. Para o processo de extração foi feita a adição de 2,0 mL de ácido nítrico 65% (v.v) em um tubo de vidro com posterior aquecimento por 2 h em banho-maria a 60°C.

3.3. Determinação de Metais e Semimetais em amostras de sedimento

As amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), utilizando-se um espectrômetro Varian (AAS240FS, Santa Clara, Estados Unidos) equipado com correção de fundo de deutério (LINO et al., 2016). Os elementos-traço analisados foram alumínio (Al), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn). A determinação de arsênio (As) nas amostras de sedimento superficial foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS), utilizando um

espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman (Analytik Jena). Uma solução de nitrato de paládio $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck No. B9366989 710) foi utilizada como modificador químico. A adição de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ ocorreu em cada extrato analisado.

3.4. Coleta e identificação de anfíbios anuros

As coletas de anfíbios foram feitas por buscas ativas noturnas padronizadas em transectos de 1 hora e 30 minutos (Figura 6a). Foram realizados três transectos por ponto amostral nos hidroperíodos secos. E cinco transectos por ponto amostral nos períodos chuvosos. Os indivíduos coletados (Figura 6b) foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados até a base de campo para a coleta dos dados biológicos e extração sanguínea. Os indivíduos coletados foram identificados quanto a espécie, sexo e estágio de desenvolvimento.

Figura 6 - Coleta de anfíbios às margens do Rio Paraopeba. (a) Busca ativa noturna; (b) Coleta do indivíduo.



Fonte: A autora, 2023.

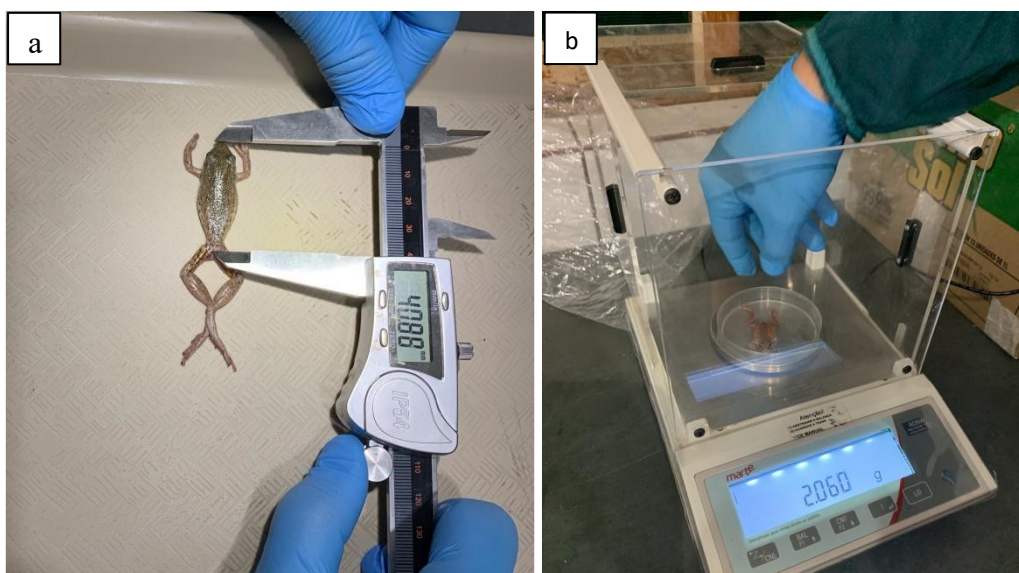
A identificação das espécies de anfíbios foi realizada com base na descrição do Guia de Anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia. Este guia reúne informações de mais de 20 anos de pesquisa e contempla 459 espécies de anfíbios que correspondem a cerca de 85% da diversidade total de anfíbios do bioma da Mata Atlântica (HADDAD et al., 2013).

Já o estágio de desenvolvimento foi avaliado de acordo com o tamanho do indivíduo, juntamente com o amadurecimento de características reprodutivas, como por exemplo, o calo nupcial, a pigmentação da pele e a presença de características sexuais secundárias, todos essenciais para determinar a maturidade sexual em anfíbios, conforme evidenciado em estudos anteriores (NASCIMENTO et al., 2015; TOLOSA et al., 2015).

A determinação do sexo foi realizada com base na observação de características morfológicas distintas, incluindo a presença de fendas vocais, ovócitos e/ou ovidutos (nos espécimes dissecados), além de dimorfismos sexuais reconhecidos na literatura (TOLOSA et al., 2015; GOLDBERG et al., 2016; MORI et al., 2022).

Além disto, foram coletadas as medidas morfométricas quanto ao tamanho e a massa corporal dos espécimes. O comprimento rosto cloacal (CRC) foi realizado com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01mm (Figura 7a) e a massa aferida em uma balança semi-analítica (AD500, Marte, Brasil) de precisão de 0,001g (Figura 7b).

Figura 7 - Avaliação de parâmetros morfológicos dos anuros coletados às margens do Rio Paraopeba: (a) comprimento rosto cloacal (CRC) utilizando um paquímetro digital e (b) massa utilizando uma balança analítica.



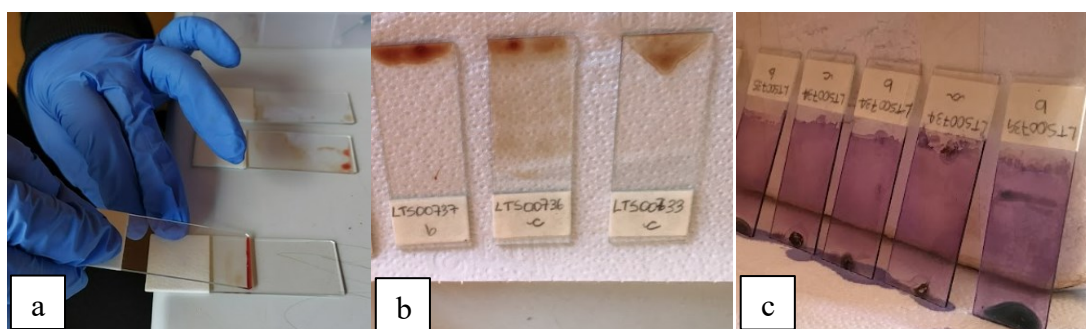
Fonte: A autora.

3.5. Extração e preparo das amostras sanguíneas

No laboratório, os anfíbios foram eutanasiados devido a necessidade de coleta de múltiplos tecidos destinados a diferentes tipos de análises. Nesses indivíduos, após

administração de anestesia e verificação da ausência de reflexos, a extração sanguínea foi realizada por punções cardíacas, com auxílio de seringas de 0,5 mL (agulha de 8 mm de comprimento e 0,33 mm de diâmetro). Em média, três lâminas foram preparadas para cada indivíduo coletado (a, b e c). As lâminas foram preparadas com o esfregaço de uma gota de sangue ($\pm 10 \mu\text{L}$) (Figura 8a) e secas em temperatura ambiente. Após o material secar por completo, as lâminas foram submetidas a um banho de 4 minutos em Metanol P.A. (100%) para a fixação e secas em temperatura ambiente (Figura 8b). Após a secagem, as lâminas foram coradas por 12 minutos em Giemsa 5%, escurridas o excesso da solução corante e novamente secas em temperatura ambiente (Figura 8c) (PELUSO et al., 2020; POLLO et al., 2017; SALOMÃO; MARQUES, 2014, 2015). Ao final do processo, as lâminas foram identificadas e armazenadas em caixas apropriadas ao abrigo de luz e umidade.

Figura 8 – Preparo das lâminas com amostras de sangue dos anuros coletados às margens do Rio Paraopeba. (a) Técnica do esfregaço, (b) lâminas secando após retirada do banho de fixação com metanol e (c) lâminas secando após retiradas do banho de coloração com Giemsa a 5%.



Fonte: a Autora.

3.5.1. Análise de Micronúcleo (MN) e outras Anomalias Nucleares (AN)

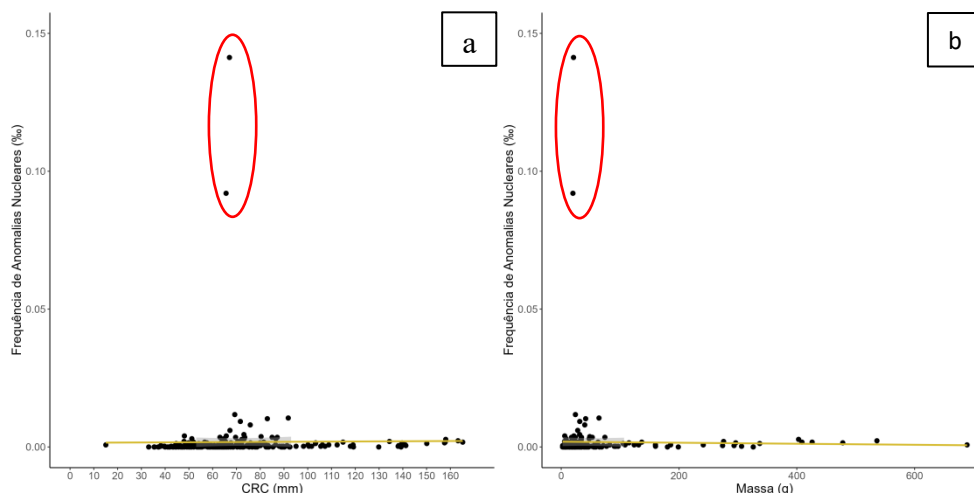
O ensaio de genotoxicidade foi realizado a partir da verificação e avaliação da frequência de aparecimento dos micronúcleos (MN) e de outras Anomalias Nucleares (AN) em células sanguíneas (eritrócitos) dos organismos coletados, tanto em ambientes com suspeita de contaminação, quanto de locais referência (controle negativo) conforme metodologia descrita por (ÇAVAŞ, ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; LAJMANOVICH et al., 2014; PELUSO et al., 2020; POLLO et al., 2017; SALOMÃO; MARQUES, 2014, 2015).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Nikon, Elipse E200, Tóquio, Japão) em resolução de 1000x (com imersão em óleo) para contagem dos eritrócitos com a presença de MN e/ou AN. Em cada lâmina foram observadas 2000 células em triplicata, totalizando 6.000 células avaliadas por organismo. As lâminas foram codificadas e contadas por uma mesma pessoa (revisão cega “*blind review*”). Os MN foram identificados com base nos seguintes critérios: (i) claramente separado do núcleo principal; (ii) tamanho máximo de até um terço do núcleo principal; (iii) mesma cor, intensidade e plano de foco; (iv) não refráteis (FENECH et al., 2003). As outras anormalidades nucleares (AN) foram identificadas com base nos seguintes critérios: binúcleo = células com dois núcleos de tamanhos aproximadamente iguais, com a mesma cor e intensidade; *blebbed* = núcleos com uma pequena evaginação, ainda ligada ao núcleo; *notched* = núcleos com um formato de corte bem definido (CARRASCO et al. 1990; FENECH et al., 2003). As frequências de MN e AN foram expressas por mil células (‰).

3.6. Análise estatística dos dados

A fim de melhor explicar o comportamento dos dados analisados foram feitas regressões lineares das variáveis CRC e massa. Conforme os gráficos 4a e 4b, os 2 *outliers* (*Rhinella* gr. *crucifer* do ponto J4 e *Boana crepitans* do ponto J60) foram desconsiderados do próximo passo na análise do GLM (*Generic Linear Model*).

Gráfico 4 - Regressão linear da frequência de anomalias nucleares presentes em células sanguíneas de anuros com as características morfológicas dos animais(%). Comprimento rosto coaclal em milímetros (a) e a massa em gramas (b) com destaque (elipse vermelha) dos *Outliers*.



Fonte: A autora, 2024.

As análises estatísticas foram realizadas no *software* R (versão 4.1.2, R Core Team, 2021) a partir da função GLM (*Generic Linear Model*) disponível no pacote base *stats*. Considerando o tipo de dado analisado (frequência de anomalias nucleares a cada 1000 células) para este trabalho foi utilizado a família quasi-binomial. A frequência de anomalias nucleares sempre foi a variável resposta, enquanto foram feitas combinações das variáveis explicativas. As variáveis utilizadas como explicativas foram: distância da confluência, massa, CRC, espécie, gênero, sexo, estágio de desenvolvimento e concentração de metais e semimetais.

Inicialmente, cinco modelos com combinações diferentes das variáveis explicativas (Tabela 2) foram analisados a fim de se avaliar qual modelo seria mais explicativo.

Tabela 2 - Variáveis explicativas utilizadas em cada modelo.

Variáveis explicativas	Modelos				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
CRC	S	S	S	N	S
Distância da confluência	S	S	S	S	S
Hidroperíodo	S	S	S	S	S
Espécie	S	N	S	S	N
Gênero	N	S	N	N	N
Sexo	S	S	N	N	S
Massa	S	S	S	S	S
Estágio	S	S	N	N	S

Legenda: S - indica que esta variável foi utilizada no modelo e N - indica que a variável não foi utilizada no modelo.

Os modelos 3, 4 e 5 foram os que melhor explicaram a interação entre os dados, segundo o r^2 e a diagnose básica. A diagnose avaliou: a homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos, sobre dispersão e inflação de zeros (SILVA et al., 2020).

Após, esses três modelos foram avaliados novamente, acrescentando os metais e semimetais (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn) como variáveis explicativas. Cada um dos 12 metais e semimetais foi avaliado com cada um dos três modelos, gerando 36 modelos.

Também foi avaliada a frequência total de anomalias nucleares (MN+AN), e dessa forma foi observado que a frequência total de anomalias gerou resultados mais significativos em comparação a avaliação individual.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Distribuição dos anfíbios ao longo da área amostrada

Durante as 3 campanhas foi coletado o material sanguíneo de 349 indivíduos, sendo 136 nas áreas controle e 213 na área impactada (Tabela 3). As espécies de anfíbios anuros que tiveram o sangue coletado foram: *Rhinella diptycha*, *Rhinella* gr. *crucifer*, *Boana lundii*, *Boana crepitans*, *Boana faber*, *Leptodactylus luctator*, *Leptodactylus fuscus* e *Scinax* cf. *Fuscovarius* (Figura 9).

Tabela 3 – Quantidade de indivíduos com material sanguíneo coletado por ponto amostral e por espécie.

Pontos amostrais	Espécies								Total	Classificação*
	<i>R. diptycha</i>	<i>R. gr. crucifer</i>	<i>B. faber</i>	<i>B. lundii</i>	<i>B. crepitans</i>	<i>L. luctator</i>	<i>L. fuscus</i>	<i>S. cf. fuscovarius</i>		
M45	3	6	14	0	0	8	0	1	32	C
M28	5	1	2	0	0	1	0	1	10	C
M24	7	6	2	2	0	3	0	3	23	C
M16	12	0	3	0	0	13	0	0	28	C
M14	2	2	1	0	0	2	0	0	7	C
M6	3	5	1	3	0	4	0	0	16	C
M4	11	6	1	0	0	2	0	0	20	C
J4	5	9	3	0	0	0	0	1	18	I
J17	1	4	3	0	0	0	0	0	8	I
J24	12	0	0	0	0	1	0	0	13	I
J40	2	0	0	0	0	0	0	0	2	I
J42	8	2	1	0	0	1	0	0	12	I
J46	0	0	1	0	0	1	0	0	2	I
J60	2	0	0	0	1	12	0	0	15	I
J106	2	0	2	0	6	8	0	0	18	I
J173	0	0	0	0	0	10	0	0	10	I
J190	8	0	4	0	2	21	0	1	36	I
J251	4	0	4	0	3	15	0	2	28	I
J294	0	0	0	0	0	6	2	1	9	I
J314	5	0	0	1	1	4	0	0	11	C
ESEC**	0	0	0	0	0	16	15	0	31	C
Total de indivíduos	92	41	42	6	13	128	17	10	349	-
Total de pontos amostrados	17	9	14	3	5	18	2	7	-	-

Legenda: *Classificação da área em Controle (C) e impactada (I). **ESEC: Os pontos amostrais da Estação Ecológica de Pirapitinga (J446, J447, J453) foram considerados como um único ponto amostral.

A espécie *L. luctator* apresentou o maior número de indivíduos (abundância) com $n=128$ representando 36,68% do total de indivíduos amostrados. Também abrangeu o maior número de pontos de coleta estando presente em 18 dos 21 pontos amostrais. *R. diptycha* foi a segunda espécie com maior abundância de indivíduos ($n=92$). Também foi a segunda espécie que abrangeu mais pontos amostrais, estando presente em 17 pontos. A terceira espécie com maior abundância de amostras coletada foi a *B. faber* ($n=42$), estando presente em 14 pontos amostrais.

R. gr. crucifer com $n=41$ foi a quarta espécie com maior número de amostras e abrangeu 9 pontos de coleta. A espécie *L. fuscus* ficou em quinto com $n=17$, coletada em apenas 2 pontos amostrais (J294 e ESEC). Sendo que apenas 2 indivíduos — o que representou 11,76% do total de *L. fuscus* coletados — foram coletados em área impactada. Em sexto, *B. crepitans* com $n=13$, sendo coletados em 5 pontos amostrais diferentes; *S. cf. fuscovarius* em sétimo com $n=10$ e em 7 pontos amostrais diferentes.

A espécie *B. lundii* foi a que teve o menor número de indivíduos ($n=6$) com amostra coletada representando 1,72% do total de amostras. Além disso, esta espécie foi coletada em apenas 3 pontos amostrais (M24, M6 e J314), sendo todos de áreas controle.

Tabela 4 - Quantitativo da identificação dos indivíduos quanto ao sexo (masculino e feminino) e estágio de desenvolvimento (jovem e adulto).

Espécies	Sexo		Estágio de desenvolvimento			
	Masc.♂	Fem.♀	NI	Jovem	Adulto	NI
<i>R. diptycha</i>	19	24	49	40	44	8
<i>R. gr. crucifer</i>	22	11	8	4	21	16
<i>B. faber</i>	20	16	6	15	19	8
<i>B. lundii</i>	2	1	3	2	2	2
<i>B. crepitans</i>	9	2	2	2	8	3
<i>L. luctator</i>	44	51	33	68	39	21
<i>L. fuscus</i>	13	1	3	3	14	0
<i>S. cf. fuscovarius</i>	4	0	6	1	1	8
Total de indivíduos	133	106	110	135	148	66

Legenda: NI - Não identificado.

Do total de indivíduos analisados, 38,1% eram machos, 30,4% fêmeas e em 31,5% não foi possível identificar o sexo. Essa alta taxa de indivíduos com sexo não identificado

pode ter influenciado os modelos estatísticos, tornando-a uma variável explicativa não significativa pela ausência de informação (Tabela 4).

Em relação ao estágio de desenvolvimento, constatou-se que 38,7% eram jovens, 42,4% adultos e 18,9% não tiveram o estágio identificado. Embora a taxa de indivíduos não identificados em relação ao estágio de desenvolvimento seja menor que a de sexo, ela também pode ter influenciado os modelos estatísticos devido à falta de dados, representando quase um quinto do total de indivíduos analisados (Tabela 4).

Tabela 5 – Características morfológicas das espécies de anuros coletadas às margens do Rio Paraopeba e pontos controle. Média [valor mínimo - valor máximo] do comprimento rosto cloacal (CRC) e massa dos indivíduos com os respectivos valores mínimo e máximo para cada espécie.

Espécies	CRC (mm)	Massa Corporal (g)
<i>R. diptycha</i>	88,96 [15,04-187,40]	113,38 [3,91-689,00]
<i>R. gr. Crucifer</i>	71,46 [37,14-91-80]	33,61 [5,13-74,15]
<i>B. faber</i>	69,05 [38,15-89,72]	21,64 [2,47-45,16]
<i>B. lundii</i>	57,09 [47,32-70,97]	11,96 [6,40-24,11]
<i>B. crepitans</i>	50,96 [39,98-65,64]	8,09 [3,47-19,89]
<i>L. luctator</i>	64,13 [35,39-97,17]	25,88 [3,38-77,01]
<i>L. fuscus</i>	43,02 [31,81-49,87]	7,36 [3,04-11,86]
<i>S. cf. fuscovarius</i>	37,26 [27,68-44,48]	3,34 [1,69-4,93]

A espécie *R. diptycha* apresentou a maior média de CRC (88,96 mm), bem como a maior média da massa corporal (113,38 g). Em contrapartida, a espécie *S. cf. fuscovarius* apresentou a menor média do CRC (37,26 mm) e a menor média da massa corporal (3,34 g) (Tabela 5).

Figura 9 - Espécies de anfíbios anuros coletados: *Leptodactylus luctator* (a), *Leptodactylus fuscus* (b), *Rhinella diptycha* (c), *Rhinella* gr. *crucifer* (d), *Boana crepitans* (e), *Boana faber* (f), *Boana lundii* (g) e *Scinax* cf. *fuscovarius* (h).



4.2. Metais e semimetais em sedimentos

Durante as três campanhas, o ponto J46 foi o que apresentou a maior concentração média de Alumínio (459,51 ppm) (Tabela 6). Enquanto o ponto M24 registrou a menor (138,28 ppm). Em relação ao Arsênio, sua maior concentração média ocorreu no ponto J60 (2,62 ppm). Já nos pontos M24, J46, J106 e J314, as concentrações ficaram abaixo do Limite de Detecção do Método (LDM) (0,82 ppm) (Tabela 6).

O Cádmio permaneceu abaixo do LDM (0,2 ppm) em todos os pontos. O Cobalto teve sua maior concentração média no ponto J46 (9,15 ppm) e a menor no ponto J314 (2,42 ppm). O Cromo apresentou sua concentração média mais alta no ponto J251 (4,10 ppm) e a mais baixa no ponto J4 (0,34 ppm). Já para o Cobre, a concentração média mais elevada foi observada no ponto J46 (11,34 ppm), enquanto a mais baixa foi no ponto J314 (3,37 ppm) (Tabela 6).

Quanto ao Ferro, sua maior concentração média foi registrada no ponto M24 (618,19 ppm), e a menor no ponto J314 (281,64 ppm) (Tabela 6). O mercúrio teve a maior concentração média no ponto M45 (0,10 ppm) e a menor no ponto J314 (0,02 ppm). O Manganês registrou sua maior concentração média no ponto M24 (227,08 ppm) e a menor no ponto J314 (71,23 ppm) (Tabela 6). Para o Níquel, a maior concentração média foi encontrada no ponto J46 (2,90 ppm) e a menor no ponto J314 (0,94 ppm). O Chumbo apresentou sua maior concentração média no ponto J46 (7,33 ppm) e a menor no ponto J4 (1,95 ppm). Por fim, o Zinco registrou sua maior concentração no ponto J60 (9,06 ppm) e a menor no ponto J42 (3,14 ppm) (Tabela 6).

No ponto J46, foram registradas as maiores concentrações médias de alumínio, cobalto, cobre, níquel e chumbo, com valores de 459,51 ppm, 9,15 ppm, 11,34 ppm, 2,90 ppm e 7,33 ppm, respectivamente.

No ponto J314, foram registradas as menores concentrações médias de Arsênio, abaixo do Limite de Detecção do Método (LDM) (0,82 ppm); o Cobalto com 2,42 ppm; o Cobre com 3,37 ppm; o Ferro com 281,64 ppm; o Mercúrio com 0,02 ppm; o Manganês com 71,23 ppm; e o Níquel com 0,94 ppm.

Tabela 6 - Média das concentrações de metais e semimetais em ppm (partes por milhão, mg/Kg) durante as 3 campanhas.

Pontos amostrais	Metais e semimetais											
	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
M45	306,72	2,65	0,20*	8,60	3,19	6,16	447,37	0,10	164,64	2,03	4,46	6,43
M28	295,05	1,50	0,20*	5,73	1,41	5,16	362,85	0,07	145,51	1,68	4,39	4,73
M24	138,28	0,82*	0,20*	6,95	0,79	5,64	618,19	0,09	227,08	2,13	4,87	4,66
M16	256,63	1,69	0,20*	7,30	1,06	4,57	373,40	0,05	142,95	1,94	4,49	4,84
M14	224,21	1,30	0,20*	6,61	1,89	6,70	348,65	0,07	143,72	1,93	3,43	7,17
M6	212,00	2,45	0,20*	6,02	1,12	4,48	337,64	0,05	134,13	1,80	3,25	4,98
J4	192,80	1,92	0,20*	4,31	0,34	3,78	324,34	0,05	131,41	1,29	1,95	3,19
J17	249,00	1,71	0,20*	5,42	1,06	5,83	351,31	0,07	150,20	1,85	4,14	5,16
J24	376,67	1,35	0,20*	8,32	1,71	8,17	335,17	0,05	130,29	2,48	5,78	7,06
J42	278,79	2,16	0,20*	3,16	0,51	3,44	318,10	0,03	119,45	1,01	4,52	3,14
J46	459,51	0,82*	0,20*	9,15	3,54	11,34	446,20	0,06	190,09	2,90	7,33	8,05
J60	393,00	2,62	0,20*	3,85	1,07	8,58	351,08	0,08	142,11	2,70	3,62	9,06
J106	266,37	0,82*	0,20*	5,02	0,85	6,49	478,29	0,06	204,26	1,64	5,07	8,16
J173	334,17	1,16	0,20*	3,65	1,35	6,79	374,41	0,06	148,57	1,75	3,91	6,53
J190	323,65	1,62	0,20*	5,55	1,12	6,71	375,83	0,05	149,81	1,74	6,01	6,13
J251	336,63	1,08	0,20*	5,47	4,10	6,20	337,48	0,06	128,64	1,82	5,24	6,90
J314	385,88	0,82*	0,20*	2,42	1,44	3,37	281,64	0,02	71,23	0,94	4,42	3,65

Legenda: Valores abaixo do Limite de Detecção do Método (LDM). O LDM do metal e semimetal é o valor indicado na tabela antes do asterisco ().

4.3. Anomalias nucleares avaliadas

A espécie *L. luctator* teve o maior número de lâminas (379) avaliadas, representando 36,62% do total de lâminas (Tabela 7). O ponto J190 teve o maior número de lâminas (104) avaliadas e também a maior média de lâminas avaliadas por organismo (13). Os pontos J40 e J46 tiveram a menor quantidade de lâminas (6) avaliadas e também a menor média (0,8) por organismo (Tabela 7).

A segunda espécie com maior número de lâminas avaliadas foi a *R. diptycha* (275), representando 26,57%. E O segundo ponto com maior quantitativo de lâminas avaliadas foi o M45 (94) e também teve a maior média (11,8) por organismo (Tabela 7).

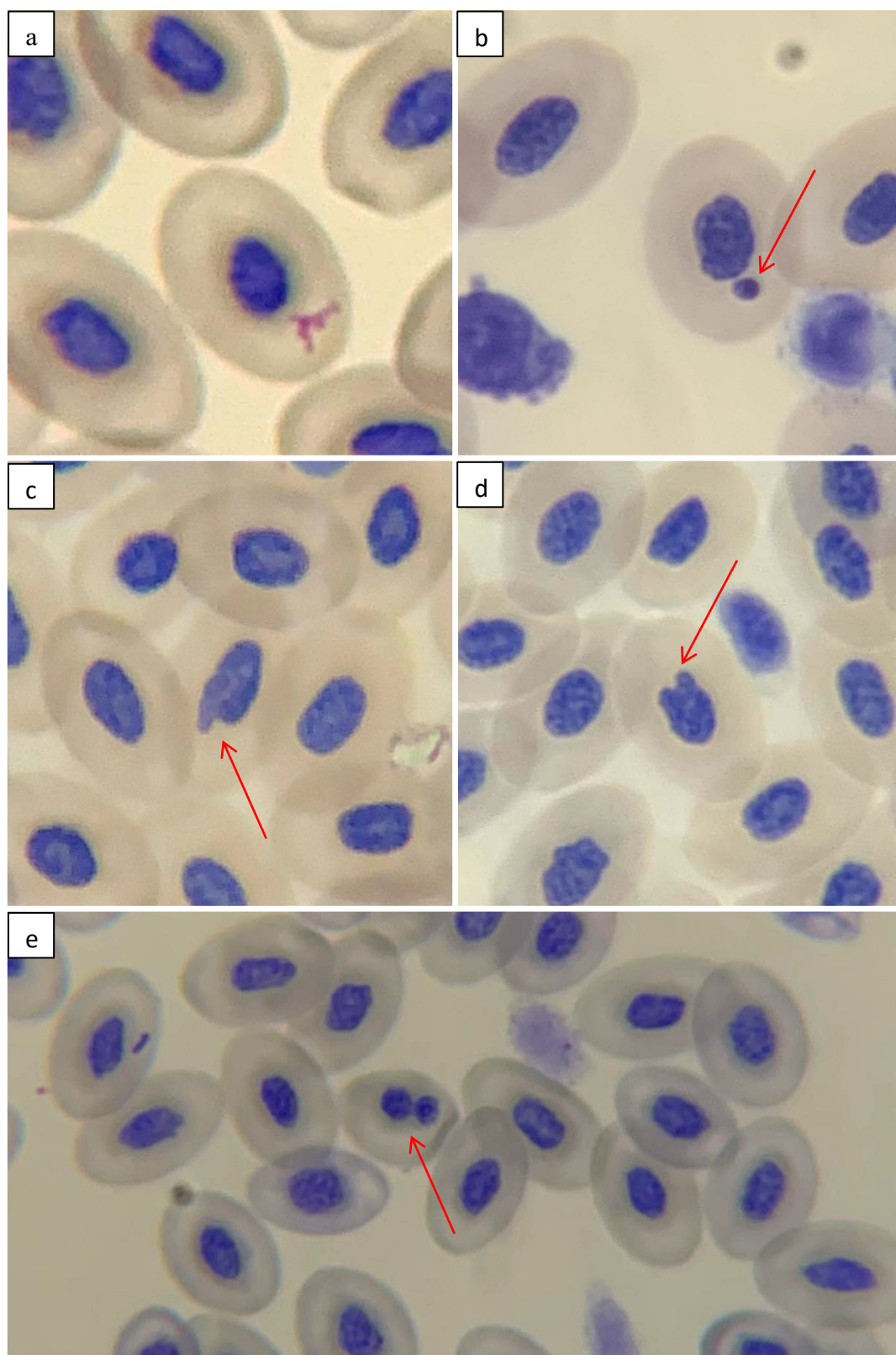
Tabela 7 - Quantitativo de lâminas por espécie e por ponto amostral com suas respectivas médias.

	Pontos amostrais	<i>R. diptycha</i>	<i>R. gr. crucifer</i>	<i>B. faber</i>	<i>B. lundii</i>	<i>B. crepitans</i>	<i>L. luctator</i>	<i>L. fuscus</i>	<i>S. cf. fuscovarius</i>	Total	Média
Quantidade de lâminas por ponto amostral	M45	9	18	42	0	0	22	0	3	94	11,8
	M28	15	5	6	0	0	3	0	1	30	3,8
	M24	21	18	6	6	0	9	0	6	66	8,3
	M16	37	0	10	0	0	39	0	0	86	10,8
	M14	6	6	3	0	0	6	0	0	21	2,6
	M6	9	15	3	9	0	12	0	0	48	6,0
	M4	33	18	3	0	0	6	0	0	60	7,5
	J4	16	27	10	0	0	0	0	4	57	7,1
	J17	3	12	9	0	0	0	0	0	24	3,0
	J24	36	0	0	0	0	3	0	0	39	4,9
	J40	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0,8
	J42	24	6	3	0	0	3	0	0	36	4,5
	J46	0	0	3	0	0	3	0	0	6	0,8
	J60	6	0	0	0	3	36	0	0	45	5,6
	J106	6	0	6	0	17	24	0	0	53	6,6
	J173	0	0	0	0	0	28	0	0	28	3,5
	J190	22	0	12	0	4	63	0	3	104	13,0
	J251	11	0	11	0	7	44	0	6	79	9,9
	J294	0	0	0	0	0	18	6	3	27	3,4
	J314	15	0	0	3	3	12	0	0	33	4,1
	ESEC*	0	0	0	0	0	48	45	0	93	11,6
	Total	275	125	127	18	34	379	51	26	1035	129,4
	Média	13,1	6,0	6,0	0,9	1,6	18,0	2,4	1,2	49,3	-

Legenda: *ESEC - Os pontos amostrais da Estação Ecológica de Pirapitinga (J446, J447, J453) foram considerados como um único ponto amostral.

As anomalias nucleares em eritrócitos (Figura 10) foram identificadas e classificadas, de acordo com Fenech et al., 2003 e Carrasco et al., 1990, em: núcleo normal, micronúcleo, núcleo *bebbled*, núcleo lobulado e binúcleo.

Figura 10 - Micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (AN) em eritrócitos das espécies de anfíbios analisadas em microscópio 1000X. Núcleo normal (a), micronúcleo (b), núcleo *bebbled* (c), núcleo lobulado (d) e binúcleo (e).



Fonte: A autora.

O ponto com maior frequência de anomalias nucleares foi o ponto J60 (92 ‰) na espécie de *B. crepitans*, em seguida o ponto com maior frequência de anomalias nucleares foi o J4 (18,61‰) na espécie de *R. gr. Crucifer* (Tabela 8). No entanto, a maior média de frequência de anomalias foi no ponto J4 (9,47‰), seguido do ponto J60 (6,45‰). O ponto J173 foi o que apresentou a menor média da frequência de anomalias nucleares, com 0,05‰ (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequência de anomalias nucleares (‰) em eritrócitos de anuros coletados ao longo do Rio Paraopeba e pontos controle por espécie e por ponto.

	<i>B. crepitans</i>	<i>B. faber</i>	<i>B. lundii</i>	<i>L. fuscus</i>	<i>L. lucinator</i>	<i>R. diptycha</i>	<i>R. gr. crucifer</i>	<i>S. cf. fuscovarius</i>	Média geral
M45	N	0,41	N	N	0,06	0,50	0,25	0,25	0,30
M28	N	0,25	N	N	0,00	0,15	0,00	0,00	0,13
M24	N	0,13	0,00	N	0,00	0,61	3,58	0,00	1,13
M16	N	0,17	N	N	2,90	0,92	N	N	1,76
M14	N	0,00	N	N	0,00	0,13	0,38	N	0,14
M6	N	0,25	0,17	N	0,00	1,00	3,30	N	1,27
M4	N	0,25	N	N	0,13	0,48	0,29	N	0,38
J4	N	0,33	N	N	N	0,40	18,61	0,00	9,47
J17	N	0,00	N	N	N	1,75	5,25	N	2,84
J24	N	N	N	N	0,00	0,81	N	N	0,75
J40	N	N	N	N	N	0,46	N	N	0,46
J42	N	0,00	N	N	0,00	0,78	0,50	N	0,60
J46	N	0,25	N	N	0,00	N	N	N	0,13
J60	92,00	N	N	N	0,35	0,25	N	N	6,45
J106	1,33	0,13	N	N	0,03	0,13	N	N	0,49
J173	N	N	N	N	0,05	N	N	N	0,05
J190	0,38	0,88	N	N	0,18	0,75	N	0,50	0,40
J251	1,17	0,56	N	N	0,25	0,81	N	0,38	0,48
J294	N	N	N	0,00	0,08	N	N	0,00	0,06
J314	0,50	N	0,00	N	0,13	0,40	N	N	0,27
ESEC*	N	N	N	0,12	0,25	N	N	N	0,19
Média geral	8,06	0,35	0,08	0,10	0,44	0,64	5,65	0,15	1,34

Observação: a média geral considera a quantidade de indivíduos por ponto amostral.

Legenda: N - não teve indivíduo coletado nesse ponto; *ESEC - Os pontos amostrais da Estação Ecológica de Pirapitinga (J446, J447, J453) foram considerados como um único ponto amostral.

4.4. Seleção de variáveis, análises e modelos

Após a avaliação dos 5 modelos, os modelos 3, 4 e 5 foram os que melhor explicaram a interação entre os dados, segundo o r^2 e a diagnose básica.

No Modelo 3 (Tabela 9), grande parte dos metais e semimetais que apresentaram alguma significância estatística (As, Cu, Fe, Hg, Mn, Zn) o estimate foi negativo, o que indica uma proporcionalidade inversa dessas variáveis explicativas com a variável resposta (frequência de anomalias nucleares). Ou seja, segundo o Modelo 3, quanto maior a concentração desses metais e semimetais, menor a frequência de anomalias nucleares.

A distância da confluência também apresentou diferença estatística para quase todos os metais, sendo esta também inversamente proporcional, quanto maior a distância do ponto de confluência, menor a frequência de anomalias nucleares (Tabela 9). O CRC apresentou significância ($p \leq 0,01$) para todos os metais e semimetais avaliados, porém neste caso o estimante foi positivo (Tabela 9).

Já em relação as espécies avaliadas, somente *Boana faber*, *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus luctator* apresentaram alguma significância estatística em relação a presença dos metais e semimetais avaliados (Tabela 9).

Tabela 9 - Significância estatística das variáveis explicativas no Modelo 3.

Modelo 3												
metal	Al N	As _**	Cd NA	Co N	Cr N	Cu _**	Fe _**	Hg _**	Mn _**	Ni N	Pb N	Zn _*
int.	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***
CRC	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Dist.	.	_*	_*	_*	_*	._	_*	_**	_*	_*	N	_*
Seco	N	N	N	N	._	N	_*	N	N	N	N	N
Chuv.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
BF	_**	_***	_**	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***
BL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
BC	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
RD	_**	_**	_**	_**	_***	_**	_**	_**	_**	_**	_**	_**
RC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
LL	_**	_*	_**	_**	_***	_**	_**	_**	_**	_**	_**	_**
LF	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
SF	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Massa	N	._	N	N	N	N	N	._	N	N	N	N

Legenda: int. - *intercept*, CRC - comprimento rosto coacial, Dist. - distância da confluência, Seco - hidroperíodo seco, Chuv. - hidroperíodo chuvoso, BF - *Boana faber*, BL - *Boana lundii*, BC - *Boana crepitans*, RD - *Rhinella diptycha*, RC - *Rhinella* gr. *crucifer*, LL - *Leptodactylus luctator*, LF - *Leptodactylus fuscus*, SF - *Scinax* cf. *fuscovarius*, Sexo M - macho, Sexo F -fêmea, N - não apresentou diferença estatística significativa, I - intercept, hífen “-” - representa o valor negativo do *estimate*, $p \leq 0$ ‘***’, $p \leq 0,001$ ‘**’, $p \leq 0,01$ ‘*’, $p \leq 0,05$ ‘.’ $p \leq 0,1$ ‘ ’ $p \leq 1$.

No Modelo 4 (Tabela 10), grande parte dos metais e semimetais avaliados apresentaram significância estatística, sendo o *estimate* negativo também.

A distância da confluência também apresentou diferença estatística para quase todos os metais, sendo esta também inversamente proporcional, quanto maior a distância do ponto de confluência, menor a frequência de anomalias nucleares (Tabela 10). No entanto, no Modelo 4 a massa apresentou diferença estatística, sendo o estimante positivo, ou seja, quanto maior foi a massa, maior frequência de anomalias nucleares verificadas. Isso corrobora com o fato destes organismos acumularem algumas substâncias ao longo da vida, sendo razoável pensar que o tamanho e a massa são proporcionais ao tempo de vida e o acúmulo tende a aumentar com o tempo de vida, em uma área contaminada (ZOCHE et al., 2014; FUENTES et al., 2020; OSMAN et al., 2021)

Já em relação as espécies avaliadas, somente *Boana faber*, *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus luctator* também apresentaram alguma significância estatística em relação a presença dos metais e semimetais avaliados (Tabela 10).

Tabela 10 - Significância estatística das variáveis explicativas no Modelo 4.

Modelo 4												
metal	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
	N	**	NA	N	N	**	**	*	**	N	N	*
int.	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Dist.	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*	N	*
Seco	N	N	N	N	-	N	**	N	N	N	N	N
Chuv.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
BF	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
BL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
BC	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
RD	*	*	*	**	**	**	**	*	*	*	**	**
RC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
LL	*	*	*	**	**	*	*	*	*	*	**	**
LF	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
SF	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Massa	*	N	*	*	*	*	N	*	N	*	*	*

Legenda: int. - *intercept*, CRC - comprimento rosto coaclal, Dist. - distância da confluência, Seco - hidroperíodo seco, Chuv. - hidroperíodo chuvoso, BF - *Boana faber*, BL - *Boana lundii*, BC - *Boana crepitans*, RD - *Rhinella diptycha*, RC - *Rhinella* gr. *crucifer*, LL - *Leptodactylus luctator*, LF - *Leptodactylus fuscus*, SF - *Scinax* cf. *fuscovarius*, Sexo M - macho, Sexo F - fêmea, N - não apresentou diferença estatística significativa, I - *intercept*, hífen “-” - representa o valor negativo do *estimate*, $p \leq 0$ ‘***’ $p \leq 0,001$ ‘**’ $p \leq 0,01$ ‘*’ $p \leq 0,05$ ‘.’ $p \leq 0,1$ ‘ ’ $p \leq 1$.

O Modelo 5 apesar de também ter apresentado significância estatística com o *estimate* negativo para grande parte dos metais e semimetais avaliados, este modelo foi o único que apresentou diferença estatística significativa diretamente proporcional a variável resposta para algum metal, no caso, o Cromo ($\leq 0,05$) (Tabela 11).

Existem estudos que investigam e apontam o Cr como um contaminante com potencial efeito genotóxico em girinos e sapos (FERNANDO et al., 2016; DO NASCIMENTO MONTEIRO et al. 2018). Em seu estudo, Fernando et al. (2016), constatou aumento da frequência de micronúcleos em sapos da espécie após exposição nas baixas concentrações (0,0015; 0,003; 0,015; 0,03; 0,15 mg/L) de cromohexavalente (Cr^{6+}). Efeitos letais e subletais foram constatados em altas concentrações (0,002, 0,02, 0,2, 1,0 e 2,0 mg/L) de Cr^{6+} . Apesar disso, ainda não é possível concluir que a presença de Cromo no sedimento seria o principal responsável pelo aparecimento de anomalias nucleares no material sanguíneo dos anfíbios deste estudo.

A distância da confluência também apresentou diferença estatística para quase todos os metais, sendo esta também inversamente proporcional, quanto maior a distância do

ponto de confluência, menor a frequência de anomalias nucleares (Tabela 11). Outra variável que apresentou diferença estatística foi o estágio de desenvolvimento classificado como jovem, em relação a todos os metais e semimetais avaliados.

Os modelos que consideraram a frequência de todas as anomalias nucleares (MN+AN) mostraram-se mais eficazes na explicação da relação entre as variáveis explicativas e a variável resposta (frequência de anomalias nucleares), em comparação com os modelos que as consideraram separadamente.

Tabela 11 - Significância estatística das variáveis explicativas no Modelo 5.

Modelo 5												
	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
metal	N	_*	NA	_*	*	_*	_*	N	_*	N	N	-.
int.	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_**	_***	_***	_***	_***	_***
CRC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Dist.	_*	_**	_*	_**	_**	_*	_**	_*	_**	_*	_*	_*
Seco	N	N	N	N	N	N	-.	N	N	N	N	N
Chuv.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
Sexo M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sexo F	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.
Massa	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Estágio jovem	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***	_***
Estágio adulto	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.	int.

Legenda: int. - *intercept*, CRC - comprimento rosto coaclal, Dist. - distância da confluência, Seco - hidroperíodo seco, Chuv. - hidroperíodo chuvoso, Sexo M - macho, Sexo F -fêmea, N - não significante, a, I - intercept, hífen “-”- representa o valor negativo do estimate, $p \leq 0$ ‘***’ $p \leq 0,001$ ‘**’ $p \leq 0,01$ ‘*’ $p \leq 0,05$ ‘.’ $p \leq 0,1$ ‘ ’ $p \leq 1$.

5. CONCLUSÃO

Apesar da baixa incidência em certos trechos, as espécies *L. luctator*, *R. diptycha* e *B. faber* demonstraram uma ampla distribuição ao longo da área de estudo, abrangendo 18, 17 e 14 pontos de coleta, respectivamente, dos 21 pontos amostrados neste projeto. Portanto, a abundância dessas três espécies neste local, combinada com características naturais dos anuros (ex.: sensibilidade a mudanças ambientais e capacidade de transitar entre ambientes aquáticos e terrestres), sugere que eles sejam potenciais bioindicadores para o estudo em questão.

As concentrações médias de Fe [281,64 ppm - 618,19 ppm], Al [138,28 - 459,51 ppm] e Mn [71,23 ppm - 227,08 ppm] no sedimento foram altas ao longo de todo o rio, incluindo nas áreas controle a montante e a jusante. As elevadas concentrações desses metais ao longo de todo rio sugerem que, a presença desses metais não está necessariamente associada ao rompimento da barragem de rejeito de Brumadinho (2019), mas possivelmente decorre das características geológicas da região, aliadas às intensas atividades mineradoras locais. Contudo, as maiores concentrações médias para Alumínio, Arsênio, Cobalto, Cromo, Cobre, Níquel e Zinco foram pontos amostrados a jusante do rompimento barragem.

A frequência média de todas as anomalias nucleares foi observada como sendo mais elevada no ponto J4, o qual representa o primeiro local de coleta a jusante da confluência do Rio Paraopeba com o Ribeirão Ferro-Carvão. Embora esse indício sugira uma possível associação, ele não fornece uma conclusão definitiva, destacando a necessidade de investigações adicionais para a obtenção de resultados conclusivos.

Quando os metais e semimetais mostraram significância estatística em algum modelo, essa significância foi inversamente proporcional à variável resposta, exceto para o Cromo ($p \leq 0,05$). No entanto, apenas com essa informação, não foi possível concluir que o Cromo seja o principal contaminante causador do efeito de toxicidade genética.

O sexo não demonstrou significância em nenhum modelo, o que pode ser atribuído à falta de dados, conforme evidenciado anteriormente no estudo. Aproximadamente 31,5% dos indivíduos não tiveram seu sexo identificado.

O CRC mostrou significância estatística ($p \leq 0,01$) em todos os modelos que utilizaram os metais e Arsênio (semimetal), baseado no Modelo 3 de variáveis

explicativas, enquanto não demonstrou significância estatística em nenhum dos que se basearam no Modelos 5. O modelo 4 não incluiu a variável CRC.

A massa não apresentou significância em nenhum dos Modelos 5, enquanto no Modelo 4 foi significativa para quase todos os metais, com exceção do As, Fe e Mn. No Modelo 3 mostrou significância ($p \leq 0,1$) apenas para As e Hg.

Dessa forma, conclui-se, portanto, que, embora haja evidências substanciais de contaminação por metais e semimetais ao longo do rio, devido à sua condição como uma área que sofreu múltiplos impactos ambientais, torna-se imprescindível a realização de estudos mais abrangentes e aprofundados para estabelecer uma conexão direta entre essa contaminação e o desastre ocorrido. A complexidade da região, juntamente com a presença de diversas fontes potenciais de poluição, demanda uma análise mais detalhada para determinar com precisão as origens e os efeitos da contaminação observada. Portanto, investigações adicionais são essenciais para compreender completamente os impactos ambientais e os riscos à saúde pública associados ao desastre de Brumadinho (MG).

6. RECOMENDAÇÕES

Sugere-se ampliar as análises genotóxicas com diferentes metodologias, como o teste cometa, para avaliar danos ao DNA. Essa abordagem pode fortalecer as conclusões deste estudo.

Além disso, é interessante investigar biomarcadores adicionais, como enzimas hepáticas, estresse oxidativo e marcadores de resposta imunológica, para obter uma compreensão mais completa dos efeitos da contaminação.

Expandir a pesquisa para incluir outras espécies de anfíbios e organismos sensíveis ao estresse ambiental em ambientes mineradores seria igualmente relevante, enriquecendo nossa compreensão dos impactos da atividade mineradora.

REFERÊNCIAS

- ABAS, Azlan. A systematic review on biomonitoring using lichen as the biological indicator: A decade of practices, progress and challenges. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 107197, 2021.
- AGBOOLA, O. et al. A review on the impact of mining operation: Monitoring, assessment and management. **Results in Engineering**, v. 8, p. 100181, 2020.
- AGUILAR, Armando Guerrero et al. Bioindicators and biomonitoring: Review of methodologies applied in water bodies and use during the Covid-19 pandemic. 2022.
- ALMG - Assembleia Legislativa de Minas Gerais. Rompimento da barragem da Vale, em Brumadinho, completa quatro anos Disponível em: <https://www.almg.gov.br/comunicacao/noticias/arquivos/Rompimento-da-barragem-da-Vale-em-Brumadinho-completa-quatro-anos/#:~:text=No%20dia%2025%20de%20janeiro,pela%20bacia%20do%20Rio%20Paraopeba%20>. Acesso em 10 de fevereiro de 2024.
- AL-SALMAN, Aseel N. et al. Comet and Micronucleus Assays for Detecting Benzo (a) Pyrene Genotoxicity in Blood Cells of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) from the Shatt Al-Arab River in Southern Iraq. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, p. 1606-1614, 2022.
- ALVES, Wellington; FERREIRA, Paula; ARAÚJO, Madalena. Challenges and pathways for Brazilian mining sustainability. **Resources Policy**, v. 74, p. 101648, 2021.
- ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 1884-1889, 2010.
- BERGMAN-ROSAMOND, A. et al. The case for interdisciplinary crisis studies. **Global Discourse**, v. 12, n. 3-4, p. 465-486, 2022.

BOLDY, Robyn et al. Understanding the impacts of mining on ecosystem services through a systematic review. **The Extractive Industries and Society**, v. 8, n. 1, p. 457-466, 2021.

BOSCH, ROBERTO ALONSO; MARRERO, ARTURO HERNÁNDEZ. Deformities in the Cuban spotted toad *Peltophryne taladai*: A rare case of abnormal eyes. **Herpetological Bulletin**, v. 154, p. 23-25, 2020.

BUCH, Andressa Cristhy et al. Ecological risk assessment of trace metals in soils affected by mine tailings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123852, 2021.

BÜCKER, A.; CONCEIÇÃO, M. B. Genotoxicity evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waters from two sites of Itajaí-Açu River (SC, Brazil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 2, p. 51–56, 5 dez. 2012.

BUSS, Daniel Forsin; BAPTISTA, Darcílio Fernandes; NESSIMIAN, Jorge Luiz. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 465-473, 2003.

CACHADA, A.; ROCHA-SANTOS, T.; DUARTE, A. C. Soil and pollution: an introduction to the main issues. In: Soil pollution. **Academic Press**, 2018. p. 1-28.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, nov. 1990.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat. Toxicol.**, v. 74, n. 3, p. 264–71, 10 set. 2005.

CBHSF - Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. A bacia. Disponível em: <https://cbhsaofrancisco.org.br/a-bacia/>. Acesso em 28 de janeiro de 2024.

CHEN, H. et al. Ecological Factors and Anthropogenic Disturbance May Restructure the Skin Microbiota of Maoershan Hynobiids (*Hynobius maoershanensis*). **Diversity**, v. 15, n. 8, p. 932, 2023.

CHENG, J. et al. Background of land development and opportunity of land use transition. **Asian Agricultural Research**, v. 7, n. 1812-2016-144372, p. 45-48, 2015.

CRUMP, M. L. Anuran reproductive modes: evolving perspectives. **Journal of Herpetology**, v. 49, n. 1, p. 1-16, 2015.

CRUZ-ESQUIVEL, Á.; DÍEZ, S.; MARRUGO-NEGRETE, J. L. Genotoxicity effects in freshwater fish species associated with gold mining activities in tropical aquatic ecosystems. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 253, p. 114670, 2023.

CUZZIOL, A. B. P. et al. Morphological and histological abnormalities of the neotropical toad, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) larvae exposed to dexamethasone. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 1, p. 41-53, 2020.

DA SILVA, Hélio Elias et al. Genotoxic and mutagenic evaluation in *Eisenia foetida* annelids exposed to iron ore tailings from the region of Brumadinho, MG, Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 102, p. 104247, 2023.

DE LACERDA, L. Updating global Hg emissions from small-scale gold mining and assessing its environmental impacts. **Environmental Geology**, v. 43, p. 308-314, 2003.

DE MELO, Letícia Dimas et al. O rompimento do mineroduto em Santo Antônio do Grama/MG: impactos socioambientais na perspectiva da mídia nacional. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e529101623930-e529101623930, 2021.

EEA - European Environmental Agency. Soil pollution and health. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/publications/zero-pollution/health/soil-pollution>. Acesso em 20 de janeiro de 2024.

ESTES-ZUMPF, W. et al. Improving sustainability of long-term amphibian monitoring: The value of collaboration and community science for indicator species management. **Ecological Indicators**, v. 134, p. 108451, 2022.

FATIMA, M. et al. Assessment of genotoxic induction and deterioration of fish quality in commercial species due to heavy-metal exposure in an urban reservoir. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 67, p. 203-213, 2014.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v. 534, n. 1–2, p. 65–75, 10 jan. 2003.

FENECH, M. et al. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FERNANDO, V. AK et al. Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 98-105, 2016.

FREITAS, M. O. et al. New records of *Aspidoras fuscoguttatus* Nijssen & Isbrücker, 1976 (Callichthyidae, Corydoradinae) from the São Francisco river basin, Brazil. **Check List**, v. 19, n. 6, p. 901, 2023.

FUENTES, I. et al. Long-term trace element assessment after a mine spill: Pollution persistence and bioaccumulation in the trophic web. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115406, 2020.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C. Organic alkali-labile phosphates in biological materials: A generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. **Environmental toxicology**, v. 15, n. 3, p. 243-247, 2000.

GENDLER, S.; PROKHOROVA, E. Risk-based methodology for determining priority directions for improving occupational safety in the mining industry of the Arctic Zone. **Resources**, v. 10, n. 3, p. 20, 2021.

GIROTTI, S. et al. Bioindicators and biomonitoring: honeybees and hive products as pollution impact assessment tools for the Mediterranean area. **Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration**, v. 5, p. 1-16, 2020.

GOLDBERG, J. et al. Vocal sac development and accelerated sexual maturity in the lesser swimming frog, *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae). **Zoology**, v. 119, n. 6, p. 489-499, 2016.

HADDAD, Célio FB et al. **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. Anolis Books, 2013.

HENCKENS, T. Scarce mineral resources: Extraction, consumption and limits of sustainability. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 169, p. 105511, 2021.

HU, J. et al. *In situ* assessment of genetic and epigenetic alterations in frog *Rana plancyi* and *Rana limnocharis* inhabiting aquatic ecosystems associated with Pb/Zn/Cu mining. **Science of The Total Environment**, v. 779, p. 146139, 2021.

IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração. Disponível em: <https://ibram.org.br/publicacoes/>. Acesso em: 11 fev. 2024.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. ESEC de Pirapitinga completa 31 anos. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/noticias/ultimas-noticias/esec-de-pirapitinga-completa-31-anos>. Acesso em: 30 de janeiro de 2024.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de Manejo da Estação Ecológica de Pirapitinga, 2013. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado/lista-de-ucs/esec-de-pirapitinga/arquivos/esec_pirapitinga_planodemanejocompleto.pdf. Acesso em: 03 de fevereiro de 2024.

IGAM - Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Mapa das Unidades de Planejamento. Disponível em: <https://comites.igam.mg.gov.br/site/17-mapa-unidades-de-planejamento>. Acesso em 6 de fevereiro de 2024.

ISLAM, Kamrul; MURAKAMI, Shinsuke. Global-scale impact analysis of mine tailings dam failures: 1915–2020. **Global Environmental Change**, v. 70, p. 102361, 2021.

JACOBI, P. R. et al. Critical Interdisciplinary Sciences, Crises and Disasters. Editorial N° 3/2019 Threatened Amazon. **Ambiente & Sociedade**, 2019.

JIRAUNGKOORSKUL, Wannee et al. Evaluation of micronucleus test's sensitivity in freshwater fish species. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 56-63, 2007.

JISKANI, I. M. et al. Assessment of risks impeding sustainable mining in Pakistan using fuzzy synthetic evaluation. **Resources Policy**, v. 69, p. 101820, 2020.

KOSTARELOS, K. et al. Legacy soil contamination at abandoned mine sites: making a case for guidance on soil protection. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 94, p. 269-274, 2015.

LAFFON, B. et al. Genomic instability as a main driving factor of unsuccessful ageing: potential for translating the use of micronuclei into clinical practice. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 787, p. 108359, 2021.

LAJMANOVICH, R. C. et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 769, p. 7–12, 2014.

LEHR, E.; LYU, Shenyu; CATENAZZI, Alessandro. A new, critically endangered species of *Pristimantis* (Amphibia: Anura: Strabomantidae) from a mining area in the Cordillera Occidental of northern Peru (Región Cajamarca). **Salamandra**, v. 57, n. 1, p. 15-26, 2021.

LEVASSEUR, P.; ERDLENBRUCH, K.; GRAMAGLIA, C. The health and socioeconomic costs of exposure to soil pollution: evidence from three polluted mining and industrial sites in Europe. *Journal of Public Health*, p. 1-14, 2021.

LITVINENKO, V. S.; TSVETKOV, P. S.; MOLODTSOV, K. V. The social and market mechanism of sustainable development of public companies in the mineral resource sector. **Eurasian Min**, v. 2020, p. 36-41, 2020.

LIU, D. et al. Effects of endocrine-disrupting heavy metals on human health. **Toxics**, v. 11, n. 4, p. 322, 2023.

LOREDO, J.; ORDÓÑEZ, A.; ALVAREZ, R. Environmental impact of toxic metals and metalloids from the Muñón Cimero mercury-mining area (Asturias, Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 3, p. 455-467, 2006.

LUCKENEDER, Sebastian et al. Surge in global metal mining threatens vulnerable ecosystems. **Global Environmental Change**, v. 69, p. 102303, 2021.

MAUS, Victor et al. A global-scale data set of mining areas. **Scientific data**, v. 7, n. 1, p. 289, 2020.

MITKOVSKA, Vesela I.; DIMITROV, Hristo A.; CHASSOVNIKAROVA, Tsenka G. Chronic Exposure to Heavy Metals Induces Nuclear Abnormalities and Micronuclei in Erythrocytes of the Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). **Ecologia Balkanica**, 2021.

MONTEIRO, M. N. H. (2022). Impacto do rejeito de mineração em relações tróficas de Anfíbios (Monografia). Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Duque de Caxias, 2022.

MORI, E.; MAZZA, G.; LOVARI, S. Sexual dimorphism. In: Encyclopedia of animal cognition and behavior. Cham: **Springer International Publishing**, 2022. p. 6389-6395.

NASCIMENTO MONTEIRO, J. A. N. et al. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 163, p. 400-407, 2018.

NASCIMENTO, N. F. et al. Efficacy of buserelin acetate combined with a dopamine antagonist for spawning induction in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Aquaculture Research**, v. 46, p. 3093-3096, 2015.

ORTON, Frances et al. A review of non-destructive biomonitoring techniques to assess the impacts of pollution on reproductive health in frogs and toads. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 262, p. 115163, 2023.

OSMAN, Hanan Elsayed Mohamed et al. Bioaccumulation and human health risk assessment of heavy metals in food crops irrigated with freshwater and treated wastewater: A case study in Southern Cairo, Egypt. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 36, p. 50217-50229, 2021.

OWEN, J. R. et al. Catastrophic tailings dam failures and disaster risk disclosure. **International journal of disaster risk reduction**, v. 42, p. 101361, 2020.

PARENTE, C. E. T. et al. First assessment of atmospheric pollution by trace elements and particulate matter after a severe collapse of a tailings dam, Minas Gerais, Brazil: An insight into biomonitoring with *Tillandsia usneoides* and a public health dataset. **Environmental Research**, p. 116435, 2023.

PARENTE, C. E. T. et al. First year after the Brumadinho tailings' dam collapse: Spatial and seasonal variation of trace elements in sediments, fishes and macrophytes from the Paraopeba River, Brazil. **Environmental Research**, v. 193, p. 110526, 2021.

PEIXOTO, P. V. L. et al. Rupture of Brumadinho dam (Minas Gerais, Brazil): embryotoxicity in zebrafish induced by metal mixture-contaminated water. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, n. 6, p. 479-488, 2022.

PELUSO, J. et al. Biomarkers of genotoxicity and health status of *Rhinella fernandezae* populations from the lower Paraná River Basin, Argentina. **Ecological Indicators**, v. 117, n. June, p. 106588, 2020.

PETESSE, Maria Letizia; POMARO, Sofia Bergamo; DE CASTRO CAMPANHA, Paula Maria Gênova. Are fish assemblages recovering after the huge disaster of mining tailing dam collapse in Mariana (Brazil-MG)? **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 11, p. 1263, 2023.

POLLO, F. E. et al. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, p. 1-9, 2015.

POLLO, F. E. et al. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18179–18187, 2017.

POUGH, F. Harvey et al. Herpetology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1998.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Versão 4.1.2. Viena, Áustria: R Foundation for Statistical Computing, 2021.

ROCHA, R. B. et al. *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) as a bioindicator of potentially toxic chemical elements in irrigated perimeters in northeastern Brazil. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, p. 124-131, 2022.

ROTTA, L. H. S. et al. The 2019 Brumadinho tailings dam collapse: Possible cause and impacts of the worst human and environmental disaster in Brazil. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 90, p. 102119, 2020.

SALOMÃO, A. L. DE S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; MARQUES, M. Critical knowledge gaps and relevant variables requiring consideration when performing aquatic ecotoxicity assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, n. July, 2020.

SALOMÃO, A. L. DE S.; MARQUES, M. Estrogenicity and Genotoxicity Detection in Different Contaminated Waters. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 21, n. 7, p. 1793–1809, 2015.

SALOMÃO, A. L. DE S.; MARQUES, M. Quantification of alkali-labile phosphate groups in the plasma of *Oreochromis niloticus* exposed to intermittent discharges of estrogens: Effect of concentrations vs. loads. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 11, p. 1161–1172, 2014.

SEMAD - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Minas Gerais. Secretaria de Meio Ambiente lembra a importância de Minas no cenário nacional das águas. Publicado em: 26 de março de 2012. Disponível em: <http://www.meioambiente.mg.gov.br/noticias/1504-secretaria-de-meio-ambiente-lembra-a-importancia-de-minas-no-cenario-nacional-das-aguas>. Acesso em: 29 de janeiro de 2024.

SHAHMORADI, Behzad et al. Influence of iron mining activity on heavy metal contamination in the sediments of the Aqyazi River, Iran. **Environmental monitoring and assessment**, v. 192, p. 1-10, 2020.

SILVA, F. R.; GONÇALVES-SOUZA, T.; PATERNO, G. B.; PROVETE, D. B.; VANCINE, M. H. **Análises ecológicas no R**, 2020.

SILVA, M. I. A. Adaptação e capacidade antioxidante em uma população de *Phrynops geoffroanus* em resposta a agressões ambientais / Maria Isabel Afonso da Silva. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011

SILVA, T. C.; MUNIZ, F. José; TABAK, B. M. The Impact of Government Disaster Surveillance and Alerts on Local Economic and Financial Conditions. **Environmental and Resource Economics**, v. 84, n. 2, p. 559-591, 2023.

SINGH, Preeti et al. Blood lead and cadmium levels in occupationally exposed workers and their effect on markers of DNA damage and repair. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 43, p. 185-193, 2021.

SIQUEIRA, Danielle et al. Terrestrial and aquatic ecotoxicity of iron ore tailings after the failure of VALE SA mining dam in Brumadinho (Brazil). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 235, p. 106954, 2022.

SONTER, L. J. et al. Mining drives extensive deforestation in the Brazilian **Amazon**. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1013, 2017.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, n. April 2018, p. 17–36, 2019.

THOMPSON, F. et al. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135914, 2020.

TOLOSA, Y. et al. Sexual maturity and sexual dimorphism in a population of the rocket-frog *Colostethus aff. fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae) on the northeastern Cordillera Central of Colombia. **Actualidades Biológicas**, v. 37, n. 102, p. 287-294, 2015.

ULUTURHAN, E., KUCUKSEZGIN, F. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. **Water Research** 41, 1185e1192, 2007.

VÁZQUEZ, Miguel E. Hernández; JIMÉNEZ, Marco Antonio García; HERNÁNDEZ, Romeo Montejo. Anomalies in three species of anurans in the state of Chiapas, Mexico. **Reptiles & Amphibians**, v. 30, n. 1, p. e20113-e20113, 2023.

VERGILIO, Cristiane dos Santos et al. Immediate and long-term impacts of one of the worst mining tailing dam failure worldwide (Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 756, p. 143697, 2021.

VIGNERI, R. et al. Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 457, p. 73-80, 2017.

VOGEL, A. Failures of Dams—Challenges to the Present and the Future. In: IABSE Workshop: Safety, Failures and Robustness of Large Structures, Helsinki, Finland, 14-15 February 2013. 2013. p. 178-185.

WEI, L. et al. Toxic effects of three heavy metallic ions on *Rana zhenhaiensis* tadpoles. **Asian Herpetol Res**, v. 6, p. 132-142, 2015.

WELLS, Kentwood D. The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago press, 2019.

WILSON, S. A. Mining-induced displacement and resettlement: The case of rutile mining communities in Sierra Leone. **Journal of Sustainable Mining**, v. 18, n. 2, p. 67-76, 2019.

WISE - World Information Service on Energy - WISE-Uranium Project. Chronology of Major Tailings Dam Failures. Disponível em: <http://www.wise-uranium.org/mdaf.html>. Acesso em: 05 de fevereiro 2024.

WMD - World Mining Data 2023. Disponível em: <https://www.world-mining-data.info/wmd/downloads/PDF/WMD2023.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2024.

WORLANYO, A. S.; JIANGFENG, Li. Evaluating the environmental and economic impact of mining for post-mined land restoration and land-use: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 111623, 2021.

YANG, Y. et al. Response of photosynthesis to different concentrations of heavy metals in *Davidia involucrata*. PLoS One, v. 15, n. 3, p. e0228563, 2020.

YOUNG, B. E. et al. Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el Nuevo Mundo. 2004.

ZAGO, C. E. S. et al. Morphological, morphometrical and ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) blood cells, in different environments. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1005-1010, 2010.

ZHANG, Q.; WANG, C. Natural and human factors affect the distribution of soil heavy metal pollution: a review. **Water, air, & soil pollution**, v. 231, p. 1-13, 2020.

ZHAO, J. et al. Control of contaminant transport caused by open-air heavy metal slag in Zhehai, Southwest China. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 3, p. 443, 2019.

ZOCHE, J. J. et al. Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal-mining pollutants on amphibians. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 66, p. 69-77, 2014.